

# ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

## RECHERCHES SUR L'HYDROLYSE COMPARÉE DU SACCHAROSE PAR DIVERS ACIDES EN PRÉSENCE DE LA SUCRASE DE LEVURE

par M. GABRIEL BERTRAND, M. et M<sup>me</sup> ROSENBLATT.

Il y a une trentaine d'années, en 1881, Kjeldahl fit connaître l'influence remarquable exercée par les acides sur l'action hydrolysante de la sucrase (1). Depuis, un nombre considérable d'observations ont été publiées, desquelles il résulte que presque toutes les diastases sont extraordinairement sensibles à la réaction du milieu : le plus souvent, comme dans le cas de la sucrase, l'activité diastasique s'élève en présence d'une très petite proportion d'acide, passe par un maximum, puis décroît lorsque la proportion d'acide continue d'augmenter. Il est des diastases, au contraire, pour lesquelles une réaction alcaline est plus favorable.

Sauf en ce qui concerne ces conclusions générales, les observations précitées sont loin d'être d'accord : non seulement les doses d'acides ou d'alcalis considérées comme les plus favorables varient d'un expérimentateur à un autre, même lorsqu'il s'agit d'un seul réactif pour une seule diastase, mais souvent encore, c'est tantôt la réaction acide, tantôt la réaction alcaline qui est indiquée comme accélérant l'action de la diastase en expérience.

C'est que, presque toujours, les conditions expérimentales

(1) *Meddelelser fra Carlsberg Labor.*, t. I, p. 537.

ont été mal définies ou quelque notion importante négligée. Peu d'observateurs, par exemple, ont tenu compte de la nature de l'acidité, bien différente suivant qu'on l'apprécie avec l'hélianthine, le tournesol ou la phthaléine comme indicateur; la plupart ont négligé l'influence des sels et des autres impuretés accompagnant la diastase, etc.

Il n'y a rien d'étonnant, dans ces conditions, à ce que l'étude comparative des réactifs d'un même groupe, par exemple, des divers acides sur les réactions diastasiques, n'ait pas donné toutes les indications que l'on était en droit d'espérer. Ainsi, une des mieux conduites, celle de quelques acides sur la sucrase, par Fernbach (1), laisse surtout l'impression que chaque acide possède une influence spécifique, sans relation apparente avec ses autres propriétés.

Les considérations émises par l'un de nous (2), sur la constitution et le mode d'action des diastases, ont conduit à donner une importance fondamentale aux substances qui interviennent à titre de complémentaires actives dans les réactions diastasiques; à supposer, par conséquent, des relations qualitatives et quantitatives entre l'influence exercée par ces substances et l'ensemble de leurs propriétés générales. En ce qui concerne l'influence des acides, deux d'entre nous, ainsi que Sørensen (3), ont démontré expérimentalement, dans ces dernières années, l'existence de telles relations. Nous venons de trouver, en poursuivant nos recherches, que les doses de divers acides qui produisent l'activation optimale de la sucrase présentent entre elles des relations tout à fait comparables à celles qui existent entre les doses limites d'acides paralysant la peroxydiastase (4).

Dans ces nouvelles recherches, nous avons pris, comme source de sucrase, la levure haute de boulangerie. Cette levure, convenablement traitée, donne, ainsi qu'on le verra plus loin, une solution diastasique suffisamment active pour que la quantité de substances organiques et minérales introduite avec

(1) *Annales de l'Institut Pasteur*, t. III, p. 538 (1889).

(2) GAB. BERTRAND, *Bull. Soc. chim.*, 3<sup>e</sup> série, t. XVII, p. 623 (1897); *Rev. gén. des Sc.*, t. XVI, p. 459 (1905); et *Revue scient.*, t. XLVII, p. 609 (1909).

(3) GAB. BERTRAND, *Bull. Soc. chim.*, 4<sup>e</sup> série, t. I, p. 1120 (1907); — GAB. BERTRAND et M<sup>lle</sup> ROSENBAUD (aujourd'hui M<sup>me</sup> ROSENBLATT), *id.*, t. V, p. 296 (1909); — SØRENSEN, *Trav. du Labor. de Carlsberg*, t. VIII, p. 1 (1909).

(4) *Loc. cit.*



elle dans le liquide sucré puisse être considérée comme négligeable par rapport aux doses d'acides essayées. D'autre part, pour que les proportions de saccharose hydrolysé restassent sensiblement proportionnelles aux activités diastasiques, nous avons eu le soin d'employer un grand excès de saccharose.

Nous décrivons la préparation et les caractères de la solution de sucrase qui nous a servi, avant d'entrer dans le détail de nos recherches.

*Préparation de la sucrase.* — 125 grammes de levure pressée ont été désagregés entre les doigts et délayés au mortier dans un demi-litre d'alcool à 95 degrés. Après quelques minutes de contact (1), on a essoré à la trompe, dans un entonnoir en porcelaine. La masse, fortement comprimée et bien égouttée, a été triturée une seconde fois avec un demi-litre d'alcool, essorée de nouveau, délayée dans 250 cent. cubes d'éther et reversée dans l'entonnoir; enfin, après ce dernier essorage, elle a été mise à sécher dans le vide sur l'acide sulfurique.

Nous avons obtenu ainsi 35 grammes d'une poudre faiblement jaunâtre, que nous avons tenu en réserve à l'abri de la lumière, dans un flacon bien bouché.

Pour déterminer les substances solubles de cette poudre, substances parmi lesquelles se trouve la sucrase, un gramme a été trituré au mortier avec très peu d'eau (2), on a ajouté ensuite assez de liquide pour faire 200 cent. cubes; on a transvasé dans un flacon, ajouté 2 cent. cubes de toluène, bouché et mis dans une étuve à + 35 degrés. Après vingt-quatre heures, pendant lesquelles on a agité de temps en temps, on a filtré sur papier Chardin, en rejetant les premières portions, troublées par un peu de levure.

La solution, limpide et pour ainsi dire incolore, avait une réaction alcaline à l'hélianthine et à l'alizarine sulfoconjuguée, acide à la phtaléine du phénol. En opérant par comparaison avec un même volume d'eau additionnée de colorant, nous avons trouvé que 20 cent. cubes de la solution exigeaient :

2,2 c.c. de  $\text{SO}^4\text{H}^2\text{N}/50$  pour être saturés en présence d'hélianthine.

1,1 c.c. du même acide pour être saturés en présence d'alizarine.

et 2,25 c.c. de  $\text{NaOHN}/50$  pour être saturés en présence de phtaléine.

(1) Il ne faut pas prolonger trop longtemps le contact avec l'alcool, sous peine de diminuer l'activité de la préparation.

(2) L'eau qui nous a servi dans toutes nos expériences avait été redistillée dans le vide avec un appareil en verre.

D'autre part, 100 cent. cubes de cette solution ont laissé par évaporation, au bain-marie, à poids constant, 0 gr. 231 de résidu sec, dans lequel on a dosé 0 gr. 0385 de cendres. L'alcalinité de ces cendres, à l'hélianthine, a été déterminée par un titrage indirect; elle correspondait à 1, 3 cent. cubes de  $\text{SO}^4\text{H}^2 \text{N}/10$ .

Ainsi, 1 gramme de poudre diastasifère donnait :

Substances solubles dans l'eau . . . . .	0 gr. 462
Alcalinité de ces substances à l'hélianthine . . .	0 c. c. 44 de $\text{SO}^4\text{H}^2$ normal.
Alcalinité de ces substances à l'alizarine . . .	0 c. c. 22 de $\text{SO}^4\text{H}^2$ normal.
Acidité de ces substances à la phthaléine . . .	0 c. c. 44 de NaOH normal.
Cendres solubles dans l'eau . . . . .	0 gr. 077
Alcalinité de ces cendres à l'hélianthine . . .	0 c. c. 26 de $\text{SO}^4\text{H}^2$ normal.

Pour nos expériences sur l'action favorisante des acides sur la sucrase, nous nous sommes servis d'une solution dix fois plus étendue que la précédente. Nous la préparions de la même manière, mais avec 50 milligrammes seulement de poudre de levure pour 100 cent. cubes. Cette solution était employée aussitôt filtrée, et nous la renouvelions à chaque série d'expériences. Elle était assez active pour qu'un centimètre cube, correspondant à 0 milligr. 5 de poudre ou 0 milligr. 23 de substances solubles, ajouté à 15 grammes de saccharose dissous dans 84 cent. cubes d'eau, suffit à hydrolyser en vingt-quatre heures, sans aucune addition d'acide :

A la température de + 28 degrés . .	67 milligr. de saccharose;
A la température de + 40 degrés . .	111 — de saccharose;
A la température de + 55 degrés . .	38 — de saccharose,

c'est-à-dire un poids de sucre atteignant 480 fois celui des substances solubles. Bien entendu, il avait été tenu compte du faible pouvoir réducteur du sucre mis en expérience.

Cette activité, mise en regard des proportions optimales d'acides que nous allons étudier, rend tout à fait négligeables les changements de réaction apportés dans les liquides en expérience par la solution diastasique, et permet de rapporter les effets obtenus par l'addition des acides directement aux doses ajoutées.

*Saccharose.* — Pour obtenir des résultats comparables, nous avons dû opérer toujours avec le même sucre, aussi avons-nous mis de côté, dès le début de nos recherches, une provision



importante de saccharose cristallisé, aussi pur que nous avons pu en trouver dans le commerce (1).

Quinze grammes de ce saccharose, c'est-à-dire le poids employé dans chaque expérience, donnait avec 85 cent. cubes d'eau une solution qui exigeait, pour être saturée :

En présence d'hélianthine. . . . . 1 c.c. 5 de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  N/100  
et en présence d'alizarine sulfoconjugée. . . 1 c.c. 2 de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  N/100

Il y avait dans ces 15 grammes de sucre 0 gr. 0033 de cendres, formées surtout de sulfate de calcium dont l'alcalinité était saturée par 1,7 cent. cube de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  N/100, en présence d'hélianthine.

L'alcalinité de ce sucre était assez faible, on le voit, pour que nous n'ayons pas eu à en tenir compte dans nos recherches.

*Acides.* — A part les acides sulfoniques, que nous avons préparés, la plupart des acides utilisés dans nos expériences étaient des produits commerciaux dont nous avons simplement contrôlé la pureté. Dans quelques cas, où la pureté nous avait paru insuffisante, nous avons achevé nous-mêmes la purification.

L'acide lactique qui, en solution, est, comme on sait, un mélange en équilibre d'acide vrai et d'éther lactyllactique, mélange d'autant plus riche en acide que la solution est plus étendue, a été titré comme si, à la dilution à laquelle on l'utilisait, il ne renfermait que de l'acide seul.

Le sulfate monopotassique a été préparé seulement à l'état de dissolution, en ajoutant une molécule de sulfate neutre de potassium à une molécule d'acide sulfurique dilué. Les citrate, tartrate, malonate et succinate monopotassiques ou monosodiques ont été préparés aussi en solutions, en ajoutant un poids convenable de carbonate alcalin, préalablement titré, à la solution de l'acide et concentrant pour chasser le gaz carbonique.

*Exécution des expériences.* — C'est par de nombreuses séries d'expériences, effectuées avec des solutions acides dont les concentrations étaient de plus en plus voisines, que nous sommes parvenus à déterminer, à 10 p. 100 près, pour chacun des

(1) C'était un sucre de premier jet, en petits cristaux, dont le lavage à la centrifuge avait été poussé plus que de coutume.

acides ou des sels acides examinés, la dose la plus favorable à l'action de la sucrase.

L'exécution d'une série d'expériences demandait trois jours. Le premier jour, on mettait en préparation, comme il a été décrit plus haut, une solution de sucrase avec 50 milligrammes de levure tuée pour 100 cent. cubes d'eau et 1 cent. cube de toluène; on plaçait le mélange à l'étuve pour être filtré et utilisé le lendemain matin. On préparait, d'autre part, un nombre convenable de solutions acides, titrées de manière à renfermer dans 84 cent. cubes la dose d'acide qui devait former avec 85 cent. cubes la dilution à faire agir sur la sucrase. Enfin, on prélevait sur la provision de sucre en réserve un poids correspondant au nombre de matras; on pulvérisait ce sucre et on le répartissait dans les matras, par portions de 15 grammes. Une certaine quantité d'eau pure, les solutions acides et les matras étaient alors placés dans le thermostat, à  $+28^{\circ}$ .

Le lendemain matin, après avoir filtré la solution diastasique, on commençait le remplissage des matras. Dans le premier de ceux-ci, on ajoutait seulement 85 cent. cubes d'eau. Ce matras servait à mesurer l'action réductrice du sucre sur le réactif cupro-alcalin. Nous avons répété cette mesure à chaque série d'expériences pour nous prémunir contre les petites irrégularités de composition que présentent les différentes parties d'une masse de sucre cristallisé lorsqu'elle est tant soit peu importante: la nôtre pesait 25 kilogrammes.

Le second matras était additionné de 84 cent. cubes d'eau et de 1 cent. cube de solution diastasique. Il permettait de déterminer l'activité de la diastase seule.

Enfin, les autres matras étaient divisés par paires, chaque paire recevant 84 cent. cubes de l'une des solutions acides et, soit (matras impair) 1 cent. cube de solution diastasique, soit (matras pair) 1 cent. cube d'eau ou de solution diastasique préalablement inactivée par un chauffage de cinq minutes au bain-marie bouillant (1).

Les matras étaient préparés avec un intervalle de 25 minutes entre chaque paire; on les additionnait de 2 cent. cubes de toluène, puis, après les avoir bouchés et bien agités, on les plaçait dans le thermostat à  $+28^{\circ}$ .

Le dosage du pouvoir réducteur avait lieu après vingt-quatre heures d'action. On le pratiquait, suivant la méthode décrite par l'un de nous (2), en opérant sur une partie aliquote du liquide, en général 10 cent. cubes, et l'on rapportait les résultats, calculés en saccharose, à la totalité du liquide, en attribuant à celui-ci la densité 1,06. L'exactitude du dosage atteignait au moins 1 p. 100.

Nous nous sommes aperçus, au cours de nos recherches, que l'activité diastasique de la poudre de levure, ou, plus exactement des substances solubles qu'on en retire, n'était pas constante, mais diminuait peu à peu avec la durée de conservation.

Heureusement pour la rigueur des résultats définitifs, des

(1) Nous n'avons pas trouvé que la solution diastasique inactivée se comportât autrement que l'eau pure.

(2) GAB. BERTRAND, *Bull. Soc. chim.*, 3<sup>e</sup> série, t. XXXV, p. 1285 (1906).



expériences particulières nous ont convaincus en même temps que la dose optimale d'acide était, dans une large mesure, indépendante de l'activité diastasique. Nous avons obtenu, par exemple, avec l'acide monochloracétique et des quantités de sucrase variant de 1 à 4, les poids suivant de saccharose hydrolysé, en vingt-quatre heures et à  $+28^{\circ}$  :

CONCENTRATION de l'acide.	PROPORTIONS DE SUCRASE			
	1 cent. cube.	2 cent. cubes.	3 cent. cubes.	4 cent. cubes.
m/1600. . . .	68	132	221	335
m/1800. . . .	71	135	225	342
m/2000. . . .	81	151	244	349
m/2200. . . .	75	148	221	335
m/2500. . . .	75	143	218	335

On voit par ces chiffres la concentration optimale d'acide est restée voisine de m/2.000.

Néanmoins, pour que nos expériences restassent aussi comparables que possible, nous avons renouvelé jusqu'à cinq fois la préparation de la poudre de levure durant l'année qui a été nécessaire à nos recherches. A en juger par le dosage des matières solubles, répété sur deux de ces nouvelles préparations, la composition de la poudre de levure est restée la même à environ 2 p. 100 près (trouvé : matières solubles, 45,8 et 44,0 p. 100). Quant à l'activité relative de la solution de sucrase, elle n'a guère varié que dans le rapport de un à un et demi.

*Résultats expérimentaux.* — Etant données la sensibilité et la précision de la technique dont nous nous sommes servis, nous avons toujours pu déterminer nettement la quantité optimale d'acide à 10 p. 100 près ; autrement dit, la courbe représentant les résultats d'expériences a toujours présenté une inflexion accusée pour des teneurs acides différant, en plus ou en moins, de 10 p. 100 de la concentration donnée comme la plus favorable à l'action de la sucrase. Lorsqu'on fait intervenir, pour le dosage du sucre hydrolysé, la méthode polarimétrique avec, presque fatalement, une proportion trop grande de sucrase ou trop petite de saccharose, on obtient, au contraire, des courbes à plateau plus ou moins étendu, surtout avec les acides faibles, et le degré d'approximation diminue d'autant.

Ne pouvant donner en détail les résultats de nos expériences qui ont exigé près d'un millier de dosages de sucre, nous les résumerons en un tableau.

NOMS DES ACIDES	POIDS moléculaires.	CONCENTRATION		ACTIVITÉ catalytiques (HCl 100).
		optimales.	Optimales (HCl 100).	
<i>Monobasiques :</i>				
Benzène sulfonique. . . . .	158 »	m/13.000	465 »	104,4
p-Toluène sulfonique. . . . .	172 »	m/12.000	430 »	»
p-Xylène sulfonique . . . . .	186 »	m/12.000	430 »	»
Trichloracétique . . . . .	163,5	m/12.000	430 »	75,4
Naphtalène sulfonique . . . . .	208 »	m/10.000	360 »	»
Dichloracétique. . . . .	129 »	m/ 6.000	215 »	27,1
Nitrique . . . . .	63 »	m/ 3.500	125 »	100 »
Chlorhydrique . . . . .	36,5	m/ 2.800	100 »	100 »
Monochloracétique . . . . .	94,5	m/ 2.000	71,5	4,84
Formique. . . . .	46 »	m/ 400	14,3	1,53
Acétique . . . . .	60 »	m/ 300	10,7	0,40
Isobutyrique . . . . .	88 »	m/ 46	0,57	0,33
Lactique . . . . .	90 »	m/ 15	0,53	1,07
Butyrique normal. . . . .	88 »	m/ 12	0,43	»
Propionique. . . . .	74 »	m/ 10	0,36	»
Benzoïque . . . . .	122 »	Inactif à saturation m/50.		
<i>Bibasiques :</i>				
Sulfurique . . . . .	98 »	m/ 3.600	128,5	107,2
Oxalique . . . . .	90 »	m/ 500	17,9	37,14
d-Tartrique . . . . .	150 »	m/ 275	9,82	»
l-Tartrique . . . . .	150 »	m/ 275	9,82	»
Malonique. . . . .	104 »	m/ 90	3,21	6,16
Malique. . . . .	134 »	m/ 55	1,95	2,54
Succinique . . . . .	118 »	m/ 24	0,86	1,19
<i>Tribasiques :</i>				
Phosphorique. . . . .	98 »	m/ 550	19,6	18,63
Arsénique. . . . .	142 »	m/ 330	11,8	14,43
Citrique. . . . .	192 »	m/ 310	11,07	5,17
Borique . . . . .	62 »	m/ 4	0,14	»
<i>Sels acides :</i>				
Sulfate monopotassique . . . . .	136 »	m/ 850	30,4	»
Oxalate monopotassique . . . . .	128 »	m/ 28	1 »	»
Citrate monopotassique . . . . .	230 »	m/ 20	0,72	»
Tartrate monosodique . . . . .	172 »	m/ 14	0,50	»
Phosphate monopotassique. . . . .	136 »	m/ 11	0,39	»
Malonate monosodique. . . . .	126 »	m/ 5,5	0,2	»
Succinate monosodique. . . . .	140 »	Inactif à saturation 2 m.		

La première colonne comprend les noms des composés acides examinés, divisés en quatre séries : acides monobasiques, bibasiques, tribasiques et sels acides, séries dans lesquelles les termes se succèdent d'après leur activité décroissante. C'est



seulement, en effet, comme dans le cas de la peroxydiastase (1), après cette subdivision préalable qu'il est possible de faire ressortir une relation évidente entre l'influence des acides sur la sucrase et leurs propriétés générales.

Les autres colonnes indiquent successivement les poids moléculaires des composés acides, supposés exempts d'eau de cristallisation ou d'hydratation ; les concentrations optimales, en molécules-grammes par litre, d'après les courbes que nous avons dessinées dans chaque cas ; les concentrations optimales rapportées à celle de l'acide chlorhydrique, faite égale à 100 ; enfin, pour servir de termes de comparaison, les activités catalytiques des mêmes acides vis-à-vis du saccharose, quand elles ont été déterminées d'après les expériences d'Ostwald (2).

Une constatation importante ressort immédiatement de l'examen comparatif des deux dernières colonnes de ce tableau : c'est que, dans chaque série d'acides, l'ordre décroissant est le même, qu'il s'agisse de la concentration optimale vis-à-vis de la sucrase ou de l'activité catalytique vis-à-vis du saccharose. Sur les dix-huit acides qui ont été étudiés à la fois par Ostwald et par nous, il n'y en a que trois, qui fassent exception : les acides trichloracétique, dichloracétique et lactique. En négligeant ces exceptions, on pourrait donc dire, d'une manière générale, que chaque acide d'une série conserve dans le phénomène diastasique la même place, par rapport aux autres, que lorsqu'il agit seul sur la substance hydrolysable.

Cette relation, est d'accord avec la théorie des actions diastasiques émise par l'un de nous (3), théorie d'après laquelle l'acide — sous la forme qu'il affecte dans la solution diluée — est le véritable agent actif de la catalyse ; la substance colloïdale, à laquelle on attache trop étroitement d'habitude l'idée de diastase, n'étant qu'une complémentaire activante.

Si, au lieu de comparer seulement l'ordre de classement des acides, on examine la grandeur relative de leur activité, on trouve encore, comme dans le cas de la péroxydiastase, que la

(1) *Loc. cit.*

(2) *Journ. f. prakt. chem.*, 2<sup>e</sup> série, t. XXIX, p. 385 (1884). Les résultats d'Ostwald sont rapportés aux solutions normales ; nous les avons calculés en solutions moléculaires pour faciliter la comparaison.

(3) *Loc. cit.*

proportionnalité est différente en présence et en l'absence du ferment. Tandis que, pour les acides monobasiques, par exemple, l'activité varie, en présence de la sucrase, de 464,3 (acide benzènesulfonique) à 0,57 (acide isobutyrique), elle ne varie plus, pour les mêmes acides, en l'absence de la diastase, que de 104,4 à 0,33. On dirait que la substance diastasique distend l'échelle d'activité des acides. Remarquons que cette influence est moins grande sur les acides bibasiques et devient inverse sur les acides tribasiques (1).

A la suite de recherches du plus grand intérêt sur le rôle de la concentration ionique dans le dédoublement provoqué par plusieurs diastases, Sørensen est arrivé à conclure que la concentration optimale en ions hydrogène dans l'hydrolyse du saccharose par la sucrase, est, à très peu près, indépendante du réactif acide utilisé (2). Dans les circonstances où il s'est placé, cette concentration est restée comprise, pour les acides sulfurique, phosphorique et citrique, entre  $10^{-4}$  et  $10^{-6}$ . Si l'on tient compte des rapports qualitatifs et quantitatifs qui rattachent l'activité catalytique des acides sur le sucre à leur degré de dissociation électrolytique, on voit que nos résultats sont, dans leur allure générale, en accord avec ceux de Sørensen (3); il

(1) C'est même pourquoi le classement de tous les réactifs acides que nous avons étudiés en une seule série ne laisse presque pas apparaître de points communs avec le tableau d'Ostwald.

(2) En représentant en ions hydrogène les concentrations optimales données par Fernbach pour les acides sulfurique, oxalique, tartrique, succinique, lactique et acétique dans le cas de la sucrase d'*Aspergillus niger*, KANITZ (*Archiv ges. physiol.*, t. C, p. 547, 1903) avait déjà entrevu cette relation. Il aurait pu, il est vrai, en entrevoir aussi bien une autre, car il avait choisi dans les données numériques de Fernbach des valeurs tout à fait arbitraires, par exemple 0 gr. 1 d'acide tartrique ou d'acide lactique au lieu de 1 gramme et de 5 grammes.

Les recherches de H. EULER et BETH af UGGLAS (*Zeits. physiol. Chem.*, t. LXV, p. 124, 1910), et celles de L. MICHAELIS et H. DAVIDSON (*Bioch. Zeits.*, t. XXXV, p. 386, 1911) ont, au contraire, apporté une confirmation à celles de SÖRENSEN.

(3) A propos de leurs recherches sur la destruction de la sucrase de levure par les alcalis et les acides, Hudson et Paine (*Journ. Amer. chem. Soc.*, t. XXXII, p. 774, 1910) ont fourni quelques résultats numériques d'après lesquels l'hydrolyse diastasique du sucre, à la température de 30 degrés, présenterait un optimum : avec les acides bromhydrique, chlorhydrique, sulfurique et tartrique, à la concentration de  $1/2000$  normale; avec les acides nitrique, phosphorique et oxalique, à la concentration de  $1/1470$  normale; avec l'acide acétique, de  $1/1000$  normale; avec l'acide borique, de  $1/715$  et avec l'acide citrique de  $1/666$ .

Ces résultats, malheureusement, ne sont pas assez précis pour que l'on puisse en tirer avec certitude quelque relation générale.



n'en est plus tout à fait de même si l'on considère les exceptions que nous avons signalées et l'extraordinaire activité relative de certains acides en présence de la sucrase.

Le déplacement des acides trichloracétique et dichloracétique par rapport à l'acide chlorhydrique, quand on passe de la catalyse simple à la catalyse diastasique, ne peut être dû à des erreurs dans nos expériences; il existe presque aussi net, d'ailleurs, dans le cas de la peroxydiastase.

Quant à l'extraordinaire activité des acides placés en tête du tableau dans l'hydrolyse du saccharose par la sucrase, elle ne saurait s'expliquer non plus par des erreurs expérimentales. Et l'on ne peut guère l'expliquer davantage avec les notions physico-chimiques courantes. Lorsque Ostwald a déterminé l'activité catalytique des acides sur le sucre, il s'est servi de solutions acides normales, dans lesquelles la dissociation électrolytique n'était pas complète. Dans nos expériences, au contraire, lorsqu'il s'agit des acides placés en tête du tableau, la dilution est si grande qu'il faut considérer la dissociation électrolytique comme totale. Mais alors, les richesses en ions hydrogène doivent être proportionnelles aux quantités d'acides ajoutées, et l'on ne peut comprendre comment l'ion hydrogène provenant de l'acide benzènesulfonique ou de l'acide trichloracétique est environ 4 fois et demi plus actif que celui de l'acide chlorhydrique.

En résumé, dans le cas de la peroxydiastase, de la sucrase et, sans doute, de beaucoup d'autres ferments solubles, il semble nécessaire d'admettre qu'en présence de la substance colloïdale spécifique, de la complémentaire activante, l'activité des acides ne dépend pas seulement des ions hydrogène qui proviennent de leur dissociation électrolytique, mais encore, dans une large proportion, de la nature des radicaux ou anions auxquels cet hydrogène est attaché dans la molécule acide.

**RECHERCHES EXPÉRIMENTALES  
SUR LE TYPHUS EXANTHÉMATIQUE  
ENTREPRISES A L'INSTITUT PASTEUR DE TUNIS  
PENDANT L'ANNÉE 1911**

(TROISIÈME MÉMOIRE)

(Suite et fin.)

**IV**

**ANIMAUX RÉFRACTAIRES**

par CHARLES NICOLLE et E. CONSEIL.

En dehors des singes et du cobaye, les autres animaux paraissent réfractaires à l'inoculation du virus exanthématique. Nos expériences de 1909 et les essais négatifs nouveaux, dont l'exposé suit, semblent le démontrer.

D'autre part, dans leur mémoire déjà cité et paru au cours de la rédaction de cet article, Gaviño et Girard constatent la résistance du chien, du lapin, du porc, de la vache et de l'âne.

**IMMUNITÉ NATURELLE DE LA CHÈVRE, DU MOUTON, DU CHIEN  
ET DE LA POULE.**

Le 24 mars 1911, le sang du malade 62, hôpital de la Rabta, pavillon Emile Roux, au 10<sup>e</sup> jour d'un typhus grave, a été inoculé à deux *bonnets chinois*, l'un 65 neuf, l'autre 81 vacciné par une atteinte antérieure et à une *chèvre*, un *mouton*, un *chien*, un *coq*. Les inoculations furent pratiquées dans la cavité péritonéale et les températures prises pendant 40 jours.

Les résultats ont été les suivants :

*Bonnet 65* (témoin neuf), inoculé avec 5 cent. cubes de sang. *Incubation 8 jours, typhus grave de 11 jours*, suivi d'une longue période d'hypothermie (une semaine) (Courbe 24).

*Bonnet 61* (témoin vacciné), inoculé d'une même dose de sang. *Résultat négatif*.

*Chèvre*, inoculée de 17 cent. cubes de sang. *Résultat négatif*.

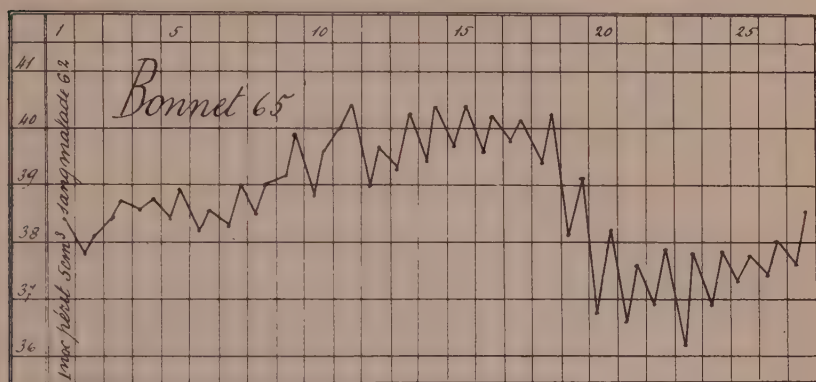
*Mouton*, inoculé de 21 cent. cubes de sang. *Résultat négatif*.



Chien (jeune), inoculé de 10 cent. cubes. *Résultat négatif.*

Coq, inoculé de 4 cent. cubes. *Résultat négatif.*

Deux souris blanches et deux rats blancs, inoculés dans les mêmes conditions, sont morts rapidement de phénomènes toxiques.



COURBE 24.

### IMMUNITÉ NATURELLE DE L'ÂNE.

Exp. I. — Ane 1, inoculé, le 25 mars, dans la cavité péritonéale, avec 40 cent. cubes de sang du malade 66, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 11<sup>e</sup> jour, d'un typhus grave. Pas de singe témoin. *Résultat négatif.*

La température, prise pendant 40 jours, oscille régulièrement entre 37 et 37,5, sauf les 9<sup>e</sup> et 10<sup>e</sup> jours, où nous constatons une légère élévation : le 9<sup>e</sup> jour, matin, 38,5; soir, 38,9; le 10<sup>e</sup> jour : matin, 38,3; soir, 38.

Exp. II. — Ane 2, inoculé, le 21 avril, dans la cavité péritonéale avec 50 cent. cubes de sang du malade 88, hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 10<sup>e</sup> jour, d'un typhus grave. Témoin le bonnet chinois 80, qui a contracté un typhus très grave de 13 jours de durée après 6 jours d'incubation (Voir plus haut, Courbe 18.) *Résultat négatif.* La température a été prise pendant 40 jours.

Mis en éveil par la constatation que nous avons faite sur le cobaye 75 de la virulence de son sang en l'absence de toute réaction thermique, nous avons prélevé sur l'âne 2, au 9<sup>e</sup> jour après son inoculation, 7 cent. cubes de sang que nous avons inoculé dans la cavité péritonéale d'un bonnet neuf, le 81. Ce bonnet n'a présenté aucune réaction; éprouvé, 21 jours plus tard, par l'inoculation intrapéritonéale de 5 cent. cubes de sang citraté du malade 120, il a contracté une infection grave de 12 jours de durée, après 12 jours d'incubation. (Voir plus haut, Courbe 12.)

### IMMUNITÉ NATURELLE DU LAPIN.

Le 8 mai, deux lapins de 1.800 à 1.900 grammes sont inoculés dans la cavité péritonéale avec 4 cent. 1/2 de sang du bonnet 78 au 4<sup>e</sup> jour d'un typhus grave. Témoin, le cobaye 100 qui a été infecté. (Voir plus haut, Courbe 8.) *Résultat négatif.* La température a été prise pendant 40 jours.

Le 25 mai, 17 jours après l'inoculation, nous avons prélevé chez l'un de ces lapins par ponction cardiaque 6 cent. cubes de sang que nous avons inoculés dans la cavité péritonéale d'un magot neuf; *ce singe n'a pas été infecté.*

## V

### ESSAIS DE TRAITEMENT

par CHARLES NICOLLE et E. CONSEIL.

#### A. — SÉRUM DE CONVALESCENTS.

Nos expériences de l'an dernier prouvent l'existence, dans le sérum des malades convalescents de typhus et des singes guéris, de propriétés préventives spécifiques. Toutefois, ces propriétés ne sont appréciables que lorsque le sérum a été recueilli dans les premiers jours qui suivent la chute de la température; rapidement ensuite, elles s'amoindrissent et disparaissent.

Antérieurement à nos recherches, plusieurs médecins, en particulier Lewaschew, Legrain, Raynaud, avaient empiriquement tenté l'emploi du sérum de malades guéris pour le traitement des exanthématiques. Les résultats obtenus par eux semblaient favorables, quoique la durée de l'infection n'en parût pas sensiblement abrégée.

Au cours de nos recherches de 1910, nous avons poursuivi quelques essais analogues : sur nos singes infectés d'abord; puis, dans un cas, sur l'homme. Les effets furent assez encourageants pour nous décider à entreprendre en 1911 des essais plus étendus.

Les résultats n'ont pas répondu à notre attente. Nous nous étions placés pourtant dans les conditions les meilleures, ne faisant usage que du sérum de malades guéris depuis 5 à 8 jours (6 le plus souvent), filtré et employé à doses répétées ou massives. Dans aucun cas, la durée de l'infection n'a été manifestement abrégée. Sous l'action du médicament, l'état général semble bien dans certains cas s'améliorer, les symptômes nerveux, en particulier, paraissent perdre de leur gravité, mais le bénéfice est faible, incertain et dans tous les cas nullement en rapport avec les difficultés d'application de ce traitement : nécessité de la présence auprès des malades de convalescents



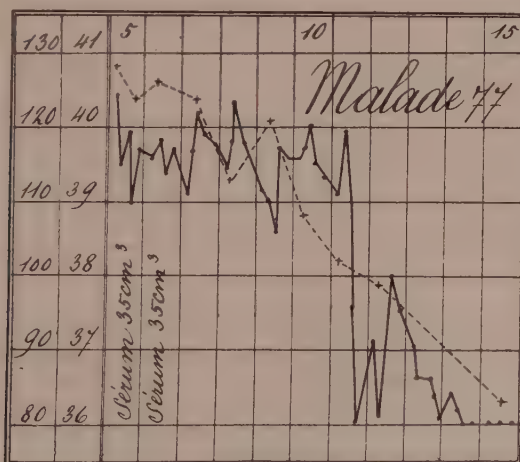
guéris depuis peu de jours, importance et danger pour ceux-ci de telles saignées, manipulations longues et délicates (filtration), etc.

On ne peut donc fonder aucun espoir sur ce mode de traitement; tout au plus conviendrait-il à des cas exceptionnels. Pour notre part, nous déclarons y renoncer.

Voici, résumées, les observations de cinq malades; les essais thérapeutiques tentés sur eux ont nécessité l'emploi de 685 cent. cubes de sérum, dose fournie par 15 convalescents; soit, en moyenne, trois guéris pour un traité.

Trois mélanges de sérums ont été employés: Mélange I provenant des malades 3, 4, 5, 41, 51, 54 ayant présenté des infections graves et guéris depuis 5 et 6 jours. Mélange II: malades 57, 58, 69, 60, 63, 64 (deux infections graves, quatre légères, guéris depuis 6 et 7 jours. Mélange III: malades 55, 56, 66, guéris d'infections de moyenne gravité depuis 6 jours.

Malade 77 (Courbe 25). Indigène, 30 ans, hôpital de la Rabta, pavillon Emile Roux, malade depuis 4 jours: fièvre, vertige, abattement, céphalée, éruption discrète, constipation, langue saburrale. Pouls, 128; temp., 40°. Sérodiagnostic de la fièvre typhoïde et des fièvres paratyphoïdes A et B négatifs, absence d'hématozoaires (mêmes résultats de ces analyses pour les malades suivants):



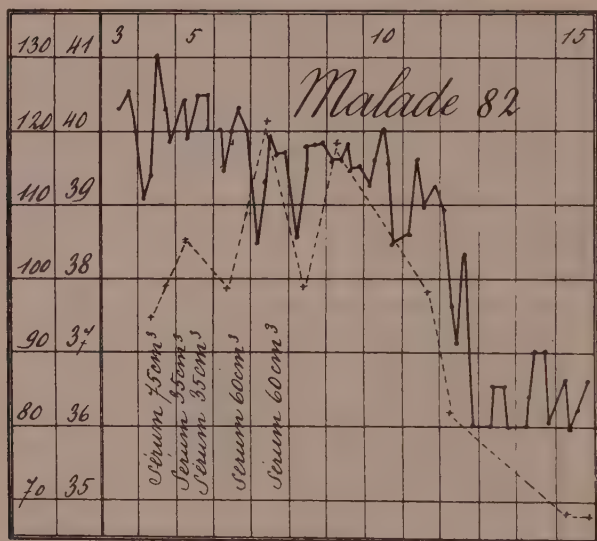
COURBE 25.

Le 31 mars, 5<sup>e</sup> jour, à 6 heures du soir, on lui injecte sous la peau 35 cent. cubes du mélange de sérums I; le lendemain matin, même dose. Ce traitement paraît avoir eu peu d'action sur l'évolution de la maladie: la fièvre persiste, la prostration demeure semblable; on note seulement l'absence de l'obnubilation habituelle du typhus; le malade répond avec netteté aux questions qu'on lui pose.

La défervescence s'est produite, de façon brusque, le 7 avril. Le malade reste encore abattu quelques jours; le pouls, cependant, est meilleur que chez la plupart des convalescents et la tension artérielle demeure assez forte, malgré la complication de phénomènes d'intolérance gastrique.

En résumé : *Traitement précoce; dose élevée de sérum (70 cent. cubes en 2 fois); action nulle sur la fièvre et la durée de l'infection; action douteuse sur l'état général et le pouls.*

*Malade 82* (Courbe 26), indigène, quinze ans, entré à l'hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 3<sup>e</sup> jour de sa maladie. Malgré une température de 40°3, il est peu abattu, cause, marche et ne se croit pas malade; il dit souffrir seulement de la tête. Dès le lendemain, l'état s'aggrave : prostration, gémissements incessants, langue saburrale, quelques taches.



COURBE 26.

Ce même jour (4 avril), 4<sup>e</sup> jour de la maladie, on lui injecte 75 cent. cubes du mélange de sérums II sous la peau et, les jours suivants, de ce même sérum : le 5 avril, matin, 35 cent. cubes; soir, 35 cent. cubes; le 6 avril, 60; le 7 avril, 60. Malgré ces injections répétées, la durée de la maladie ne paraît pas avoir été abrégée; l'état général et le pouls sont cependant un peu meilleurs que dans les cas ordinaires de typhus.

La défervescence s'est produite le 12<sup>e</sup> jour. Pendant la convalescence, le pouls se ralentit et la tension artérielle s'abaisse.

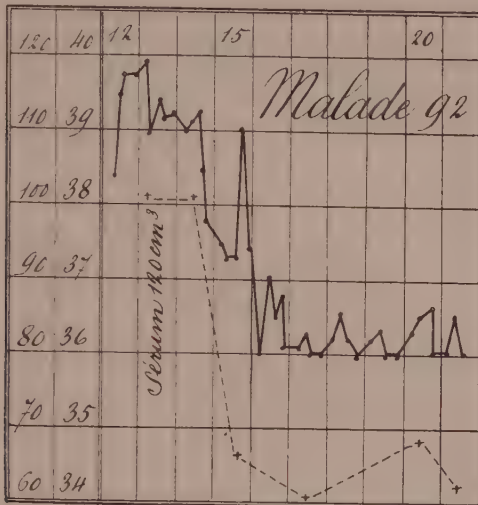
En résumé : *Traitement précoce; doses très élevées et répétées de sérum (265 cent. cubes en 5 fois); action nulle sur la fièvre; action douteuse sur l'état général; la convalescence n'a pas été meilleure que chez les malades non traités.*

*Malade 92* (Courbe 27). Indigène, vingt ans, entré à la Rabta, pavillon Emile Roux, le 11<sup>e</sup> jour de son typhus, après en avoir présenté antérieurement tous



les symptômes classiques. L'éruption est en voie de disparition, mais l'état général demeure très mauvais. Des périodes de délire violent alternent avec des périodes de prostration; le pouls seul reste assez bien frappé à 100. Le 13<sup>e</sup> jour, coma complet.

Nous lui injectons, ce jour même, 120 cent. cubes du mélange II. Le lendemain, la prostration est moindre, la malade semble se réveiller. La défervescence se produit au 15<sup>e</sup> jour; à ce moment, le pouls s'abaisse à 56 et la tension artérielle devient très faible. La convalescence a été normale.



COURBE 27.

En résumé : *Traitement tardif, dose de sérum unique, massive (120 cent. cubes), amélioration rapide de phénomènes nerveux graves, pas d'autre action.*

*Malade 96 (Courbe 28).* Indigène, vingt ans, entré à l'hôpital de la Rabta, pavillon Emile Roux, au 8<sup>e</sup> jour de sa maladie, avec les symptômes classiques du typhus. Deux jours plus tard, on lui inocule, en une fois, sous la peau, 110 cent. cubes du mélange de sérums II. A ce moment, l'exanthème est très marqué, la langue rôtie, la céphalée extrême, l'obnubilation complète, il existe un tremblement fibrillaire des muscles; température, 40°2; pouls, 118.

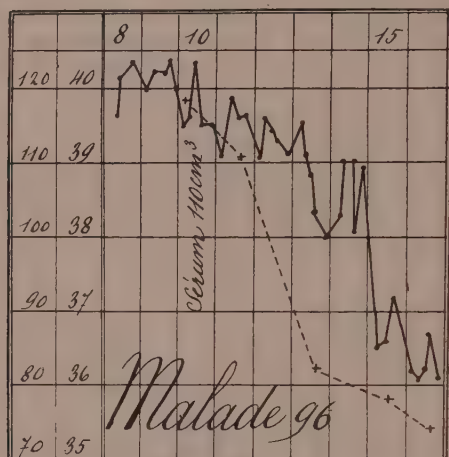
A la suite de l'injection, la température s'abaisse légèrement, la céphalée paraît s'amender, mais la maladie continue son évolution et la défervescence ne survient que le 15<sup>e</sup> jour. Convalescence normale.

En résumé : *Influence nulle d'une dose massive unique de sérum (110 cent. cubes) dans un cas d'intensité moyenne.*

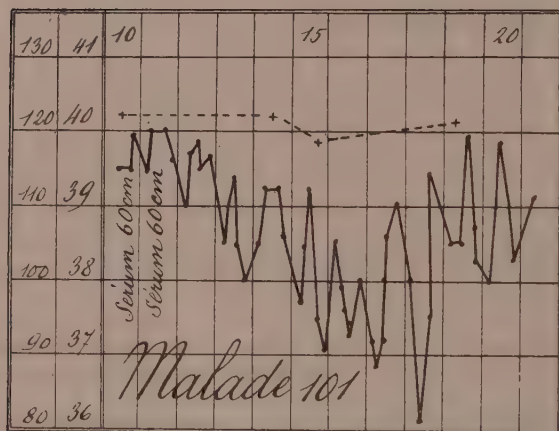
*Malade 101 (Courbe 29).* Indigène, vingt-cinq ans, entré à l'hôpital de la Rabta, pavillon Murchison, au 10<sup>e</sup> jour d'un typhus grave. Il présente alors un exanthème intense, du délire, une obnubilation intellectuelle complète; langue fuligineuse, engouement pulmonaire.

On lui injecte, sous la peau, le jour de l'entrée et le lendemain, 60 cent.

cubes du mélange de sérums III. Ce traitement ne modifie en rien l'état général; l'exanthème persiste; les symptômes nerveux s'accroissent; le regard devient fixe et, malgré une baisse momentanée de la température, le malade tombe dans le coma. La défervescence se fait en lysis du 14<sup>e</sup> au



COURBE 28.



COURBE 29.

17<sup>e</sup> jour, le pouls demeurant petit et rapide; mais bientôt la fièvre remonte, un abcès se produit au niveau de la piqûre, et, malgré son ouverture précoce, le malade ne tarde pas à succomber.

L'autopsie ne montre qu'une congestion généralisée des viscères; les capsules surrénales sont normales.

En résumé: influence nulle d'une dose élevée de sérum (120 cent. cubes en 2 fois); mort dans la convalescence, du fait d'une complication (abcès).



## B. — CHIMIOTHÉRAPIE.

L'ignorance où nous sommes encore de toute connaissance certaine de l'agent pathogène du typhus devait nous engager à essayer les nouvelles médications efficaces contre les protozoaires, et à chercher, en même temps qu'une méthode thérapeutique, un renseignement sur la nature de ce microbe.

Nous avons essayé successivement le *Salvarsan* d'Ehrlich, dont l'action sur les spirilloles est si manifeste, et l'*émétique*, employé avec quelque succès pour le traitement de certains trypanosomiases.

I. SALVARSAN. — Nous devons le produit essayé à l'obligeance du professeur Ehrlich, auquel nous sommes heureux d'adresser ici nos remerciements. Les ampoules portaient la marque *Op. 129*.

Quatre malades ont été traités; tous par injection intraveineuse; les deux premiers ont reçu le *Salvarsan* en solution alcaline, les deux suivants en solution acide.

*Malade 56* (Courbe 30). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux. Indigène quarante ans, entré au 5<sup>e</sup> jour de son infection; il vient de la prison civile où sévit alors une épidémie de typhus et présente le tableau classique des formes graves de cette maladie: courbature générale, langue saburrale, tremblements fibrillaires, exanthème typique, délire nocturne; température, 40°. Les symptômes nerveux s'accroissent le lendemain et la fièvre demeure au-dessus de 40 degrés.

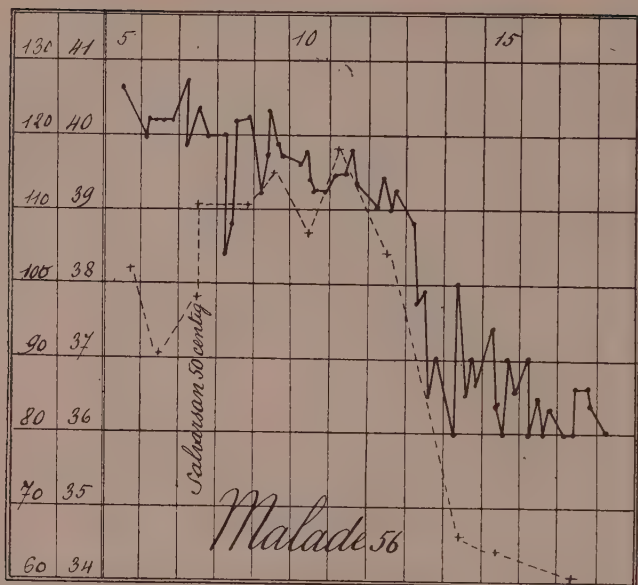
Le 7<sup>e</sup> jour au matin, nous lui injectons 50 centigrammes de *salvarsan* en solution alcaline. L'agitation persiste après l'inoculation; la température subit une baisse passagère; le lendemain le pouls reste à 110. La maladie continue son évolution; deux jours plus tard, le malade tombe dans un état de prostration profonde qui dure jusqu'au 13<sup>e</sup> jour, c'est-à-dire exactement jusqu'à la défervescence. Convalescence rapide.

En résumé: *Résultat nul dans une forme grave traitée à la période d'état.*

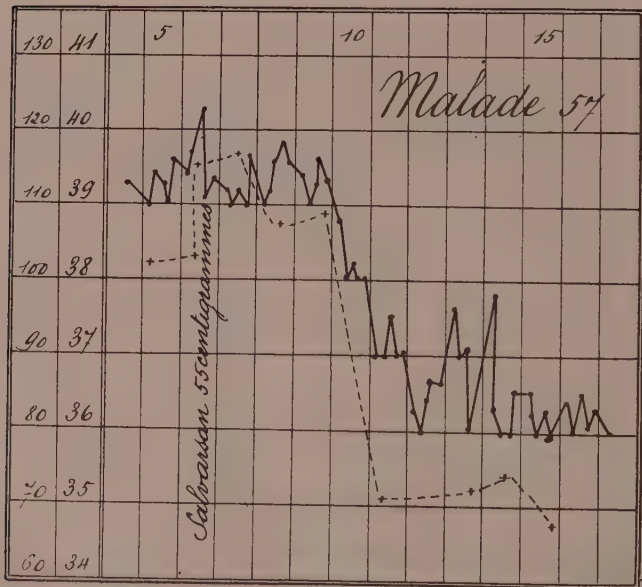
*Malade 57* (Courbe 31). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux. Indigène, vingt-cinq ans, venant de la prison civile. Entré au 4<sup>e</sup> jour de sa maladie, en présente le tableau ordinaire; l'éruption est particulièrement marquée, les symptômes nerveux sont peu accentués.

Le 6<sup>e</sup> jour, injection de 55 centigrammes de *salvarsan* en solution alcaline. Aucune modification des symptômes, l'éruption persiste, très intense; la fièvre évolue jusqu'au 10<sup>e</sup> jour de la maladie, date à laquelle se produit la défervescence. Convalescence normale.

En résumé: *Effet nul dans une forme de gravité moyenne, traitée assez tôt.*



COURBE 30.

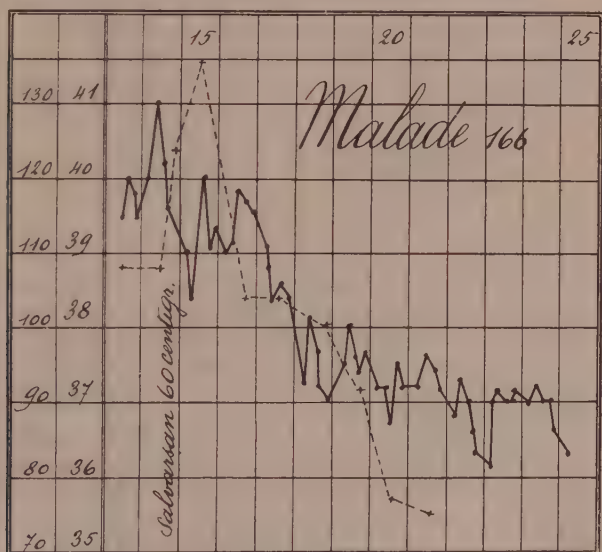


COURBE 31.



Devant ces résultats négatifs, nous avons interrompu nos essais, lorsque nous avons eu connaissance d'un travail de G. Marañon (*Action del arsenobenzol en los enfermedades no sifiliticas. Brochure, Madrid, 1911*). Trois observations de typhus exanthématique y sont rapportées, dans lesquelles la guérison serait survenue vingt-quatre heures après l'inoculation de 60 centigrammes de salvarsan. Ces résultats brillants contrastaient singulièrement avec les nôtres; c'est pourquoi nous avons repris nos essais, en employant cette fois le médicament en solution acide. L'effet en a été déplorable.

*Malade 166* (Courbe 32). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux. Indigène, trente ans, entré dans un état de prostration grave qui le met dans l'impossibilité de fournir alors aucun renseignement. Le tableau clinique est des plus nets : éruption, langue rôtie, soubresauts tendineux, constipation, respiration stertoreuse; temp., 40; pouls, 108.



COURBE 32.

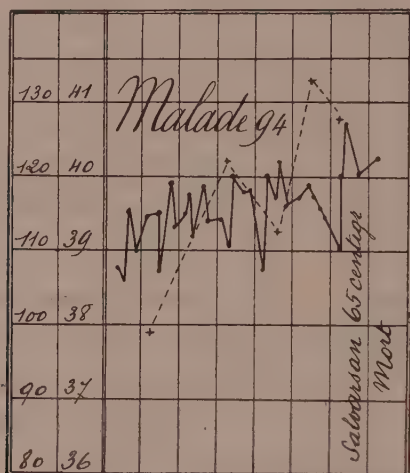
Le lendemain de l'entrée, au 14<sup>e</sup> jour de l'infection, nous lui injectons soixante-centigrammes de salvarsan, en solution acide. Après une chute passagère de la température, la maladie reprend son évolution et les symptômes ne subissent aucune modification dans les deux jours qui suivent.

La défervescence se produit seulement au 18<sup>e</sup> jour de la maladie (trois jours après l'inoculation). Le début de la convalescence s'accompagne d'une

asthénie très marquée, qui laisse le malade pendant plusieurs jours dans un état assez critique.

En résumé : *Action nulle dans un cas grave, traité à la période d'état.*

Malade 94 (Courbe 33). Hôpital de la Rabta, pavillon Émile Roux, Indigène, trente-cinq ans, entré au 4<sup>e</sup> jour de sa maladie, tableau symptomatique grave, exanthème marqué. Après une période d'excitation violente, il tombe, le 9<sup>e</sup> jour, dans un état de prostration voisin du coma ; la température s'élève à 40°7, le pouls devient très rapide, à peine perceptible.



COURBE 33.

Devant cette hyperthermie considérable et le mauvais état général, nous nous décidons à tenter encore, malgré nos échecs précédents, une inoculation de salvarsan. La dose injectée a été de *soixante-cinq centigrammes*, en solution acide. Aucune modification de l'état général à la suite de ce traitement, la température se maintient à 40°1, le pouls devient imperceptible et le malade meurt, le lendemain matin.

A l'autopsie, on constate une congestion très intense des reins avec ecchymoses par places ; les capsules surrénales sont également congestionnées et il existe un œdème étendu autour de ces organes et des reins. La rate est très hypertrophiée (paludisme ancien) et molle ; le foie pâle et mou avec quelques ecchymoses sous-capsulaires, le cœur flasque.

En résumé : *action nulle dans une forme grave, mort, et, à l'autopsie, existence de lésions dont une part doit être mise sans doute sur le compte du traitement.*

Nos essais terminés, nous avons connu le travail de Czerno Schwartz et Holpen (*Roussky Vrach*, 12 mars 1911) qui, sur deux malades atteints de typhus, traités par le salvarsan,



eurent une mort à la suite de l'inoculation intraveineuse de 35 centigrammes du produit, en solution alcaline.

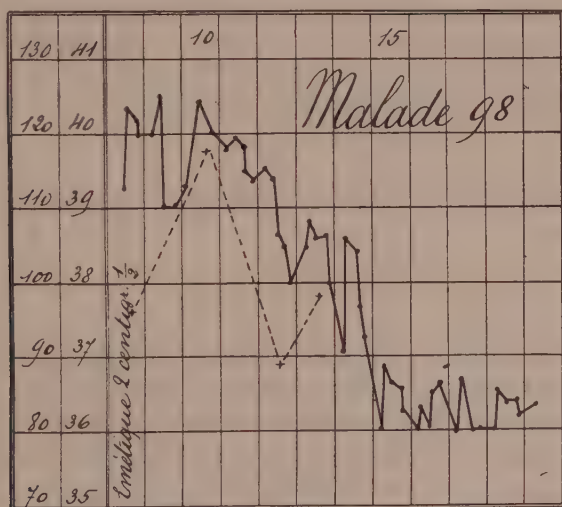
D'autre part, chez le singe infecté, Gavino et Girard (*loco citato*) n'ont tiré aucun bénéfice de l'emploi de ce médicament.

Le salvarsan se montre donc à la fois *inefficace* et *dangereux* dans le traitement du typhus exanthématique.

## II. — ÉMÉTIQUE.

Ce médicament a été essayé sur deux malades, sous forme d'injections intraveineuses d'une solution de 1/100, suivant la technique préconisée par L. Martin et H. Darré pour le traitement de la maladie du sommeil (*Bull. de la Soc. de pathologie exotique*, 11 novembre 1908).

*Malade 98* (Courbe 34). Hôpital de la Rabta, pavillon Murchison. Indigène, quarante ans, typhus d'intensité moyenne.



COURBE 34.

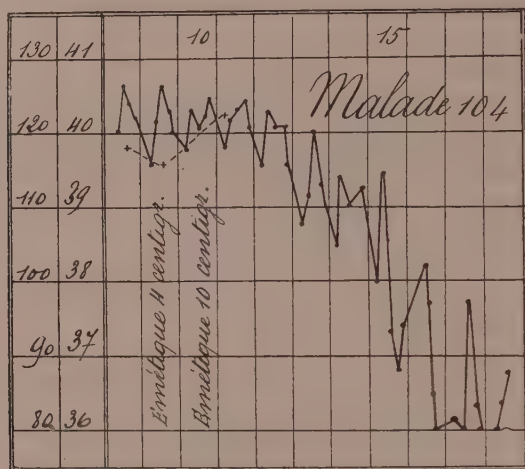
Au 8<sup>e</sup> jour de l'infection, alors que le malade présente une température de 40°4 et un exanthème très marqué, on pratique sur lui une inoculation de 25 cent. cubes de la solution, correspondant à une dose de deux centigrammes et demi d'émétique. La maladie continue son évolution et la défervescence se produit, en lysis, aux 14<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jours.

En résumé : *résultat nul.*

*Malade 104* (Courbe 35). Hôpital de la Rabta, pavillon Murchison. Indigène, vingt-cinq ans, fièvre élevée, état général assez bon.

Au 8<sup>e</sup> jour de la maladie, injection de 40 cent. cubes de la solution et, le lendemain, de 100 cent. cubes, soit au total *quatorze centigrammes d'émétique*. La maladie continue à évoluer, la chute de la température se produit au 15<sup>e</sup> jour; convalescence normale.

En résumé : *résultat nul.*



COURBE 35.

L'émétique est donc sans action sur le typhus exanthématique.

### C. — OPOTHÉRAPIE.

Plusieurs auteurs, frappés de l'analogie que présentent certains symptômes du typhus exanthématique, dans ses formes graves, avec ceux de l'insuffisance surrénale aiguë (rapidité du pouls pendant la première période, puis abaissement de la tension sanguine et asthénie) ont cherché, sans preuves cliniques ou anatomiques, à faire du typhus une maladie des capsules surrénales; d'autres, moins absolus, considèrent ces organes comme le lieu d'élection du virus exanthématique (Legrain, *Afrique médicale*, 1<sup>er</sup> janvier 1911; A. Henry, *Tunisie médicale*, 15 avril 1911; Fournié, *Thèse*, Alger, 1911).

Sur six autopsies de typhiques pratiquées par nous, *jamais il n'a été noté de lésions des capsules surrénales*, sauf dans un cas,



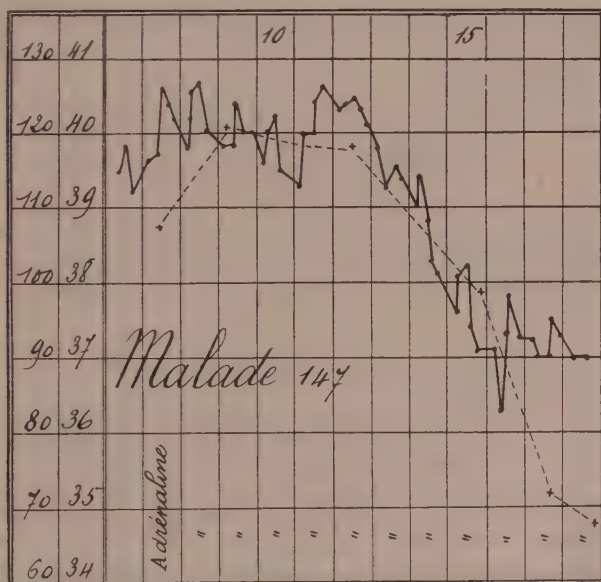
le seul où l'autopsie avait été faite tardivement. Nous sommes portés à rapporter les lésions décrites par quelques auteurs dans ces organes à des altérations cadavériques.

D'autre part, nous avons tenté sans succès le traitement par l'adrénaline de douze malades atteints de typhus. Voici leurs observations résumées avec quelques courbes, choisies parmi les plus typiques.

Chez les onze premiers malades, l'adrénaline a été administrée par *voie buccale*, aux doses de XV à XXX gouttes d'une solution à 1 p. 100, matin et soir; chez le douzième, nous avons employé la *voie sous-cutanée*.

Ces essais ne nous ont permis de constater aucune action manifeste du produit sur les troubles circulatoires (état du pouls), ni sur l'évolution de la convalescence.

*Malade 147* (Courbe 36). Rabta, pavillon Jenner. Nègre 28 ans. Typhus grave. Traité par l'adrénaline à partir du 6<sup>e</sup> jour de la maladie. Effet nul sur l'infection. Pendant toute la durée de la convalescence, le pouls est demeuré très lent, très dépressible et un état profond d'asthénie a été noté.



COURBE 36.

*Malade 179*. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène 46 ans. Typhus grave. L'adrénaline a été administrée à partir du 10<sup>e</sup> jour; effet nul, mort au 14<sup>e</sup> jour. A l'autopsie, les capsules surrénales sont normales.

*Malade 18*. Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène trente ans. Typhus grave

traité par l'adrénaline, à partir du 11<sup>e</sup> jour; action nulle; asthénie, faiblesse et lenteur du pouls dans la convalescence.

*Malade 121.* Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène vingt ans. Typhus grave (forme nerveuse), pouls à 130. L'adrénaline a été administrée à partir du 10<sup>e</sup> jour; effet nul, défervescence en lysis du 16<sup>e</sup> au 17<sup>e</sup> jour, suivie d'une chute considérable de la pression artérielle et du pouls.

*Malade 139.* Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène trente ans. Typhus de gravité moyenne, traité par l'adrénaline à partir du 13<sup>e</sup> jour. Effet nul; état critique les premiers jours de la convalescence, asthénie, pouls lent; dépressible.

*Malade 86* (Courbe 37). Rabta, pavillon Murchison. Indigène trente-cinq ans. Typhus léger; défervescence aux 10<sup>e</sup> et 11<sup>e</sup> jours. Ainsi que cela est habituel dans le typhus, le pouls est devenu lent et la pression artérielle a baissé pendant les premiers jours de la convalescence. L'adrénaline, administrée dès le début de celle-ci, n'a pas amené de modification rapide du pouls; celui-ci s'est relevé ultérieurement, ainsi que cela s'observe chez les malades non traités.



COURBE 37.

*Malade 88.* Rabta, pavillon Murchison. Indigène trente-cinq ans. Typhus grave. L'adrénaline a été administrée à partir du 10<sup>e</sup> jour. Effet nul, défervescence au 15<sup>e</sup> jour. Abaissement et ralentissement du pouls dans la convalescence.

*Malade 93.* Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène vingt-cinq ans, typhus de gravité moyenne, traité par l'adrénaline au 12<sup>e</sup> jour. Effet nul, défervescence



les 14<sup>e</sup> et 15<sup>e</sup> jours. Le pouls s'abaisse ensuite, mais la pression artérielle demeure assez bonne pendant la convalescence.

*Malade 142.* Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène vingt-cinq ans; typhus de gravité moyenne, éruption discrète, prostration marquée. Au 13<sup>e</sup> jour, alors que le pouls devient faible et rapide, on commence le traitement par l'adrénaline; résultat nul, le pouls demeure à 110, jusqu'au moment de la défervescence, survenue les 16<sup>e</sup> et 17<sup>e</sup> jours. A noter que, chez ce malade, on n'a pas observé l'abaissement de la pression artérielle et le ralentissement du pouls, ordinaires dans la convalescence.

*Malade 143.* Rabta, pavillon Emile Roux. Indigène trente ans; typhus grave, pouls fréquent et faible. Au 11<sup>e</sup> jour, malgré la chute de la fièvre, le pouls demeure filiforme et l'état général très mauvais (coma). On administre alors l'adrénaline sans aucun résultat; la mort survient dès le lendemain.

A l'autopsie, on constate les lésions ordinaires de congestion viscérale; *les capsules surrénales sont grosses, mais fermes et paraissent à l'œil nu normales.*

*Malade 146.* Rabta, pavillon Murchison. Indigène vingt-cinq ans; amené dans un état très grave (coma, exanthème intense); aucun renseignement; l'adrénaline, administrée dès l'entrée, n'amène aucune modification et la mort se produit au 4<sup>e</sup> jour de l'entrée, au milieu d'une crise d'agitation.

A l'autopsie, mêmes constatations que chez le malade précédent, *capsules surrénales normales.*

*Malade 122.* Rabta, pavillon Murchison. Indigène vingt-cinq ans, entré au 12<sup>e</sup> jour d'un typhus d'intensité moyenne. On lui injecte aussitôt, sous la peau, 1 cent. cube de la solution d'adrénaline Clin; ce traitement est continué pendant 8 jours. Action nulle sur l'évolution de la maladie; défervescence au 15<sup>e</sup> jour. Le pouls ne descend pas au-dessous de 88 et la tension artérielle demeure assez bonne pendant la durée de la convalescence.

L'adrénaline nous paraît d'un médiocre secours dans le traitement du typhus exanthématique; il conviendrait, en tout cas, de l'employer par voie hypodermique.

#### D. — ABCÈS DE FIXATION.

Nous avons essayé, d'autre part, les abcès de fixation, selon la méthode de Morsly (1) et noté, dans les nombreux cas ainsi traités depuis deux ans, une mortalité plus faible et surtout une moins grande fréquence des complications secondaires. Cependant, pour juger définitivement de l'efficacité de ce traitement, il nous paraît nécessaire de s'appuyer sur une très longue statistique, que nous ne sommes pas encore en mesure de fournir.

(1) *Soc. de Pathologie exotique*, octobre 1909.

La méthode ne saurait être, dans tous les cas, qu'un pis aller. L'abcès de fixation ne semble, en effet, pas agir sur l'évolution et la durée de la fièvre.

Nous devons des remerciements à M. Blanc, Secrétaire général du gouvernement tunisien, pour les facilités qu'il a données à nos recherches en confiant à l'un de nous la mission de diriger l'hôpital d'isolement de la Rabta.

## VI

### CONCLUSIONS

par CHARLES NICOLLE.

Les expériences relatées dans ce troisième mémoire apportent à la connaissance du typhus exanthématique un certain nombre de données nouvelles :

I. — Le cobaye est sensible au virus. L'inoculation péritonéale de 2 à 4 cent. cubes de sang d'homme ou de singe malades suffit à l'infecter. Une dose plus forte est toxique, souvent même mortelle, et les symptômes observés (paralysies, cachexie, mort rapide) ne diffèrent pas de ceux que provoque l'inoculation d'une quantité égale de sang humain normal.

L'incubation est variable : 7 à 16 jours. La maladie expérimentale se résume en une élévation de la température, d'une durée moyenne d'une semaine (4 à 11 jours); une perte légère de poids peut se produire à la fin de la période fébrile. Sans le secours du thermomètre, l'infection passerait inaperçue. Chez les cobayes sacrifiés et chez ceux qui meurent exceptionnellement pendant la fièvre, on ne note aucune lésion spéciale des organes.

Tous les cobayes inoculés avec une même dose du même virus ne réagissent pas.

Les passages de cobaye à cobaye sont possibles; nous en avons réalisé trois, Gavino et Girard onze.

Des passages alternatifs par cobayes et singes peuvent être

réussis indéfiniment et servir ainsi à la conservation du virus dans les laboratoires.

Le sang, chez le cobaye infecté, est virulent du début à la fin de la période fébrile; il peut également l'être à une période correspondante chez ceux des cobayes inoculés en même temps que les malades et qui n'ont pas réagi.

II. — Isolés par centrifugation et lavés, les globules blancs se montrent doués de la même virulence que la masse de sang de laquelle ils ont été extraits; séparés dans des conditions analogues, les globules rouges sont dépourvus de tout pouvoir pathogène ou immunisant. Le plasma semble ne devoir sa virulence relative qu'aux globules blancs ou débris leucocytaires, desquels il est impossible de le débarrasser entièrement.

Le sérum sanguin de coagulation provenant d'un singe infecté et privé par une centrifugation prolongée de tout élément cellulaire s'est montré non virulent pour l'homme, en inoculation intraveineuse.

Le liquide céphalorachidien, qui ne contient nul élément figuré, est inactif.

Ces divers faits plaident en faveur de l'hypothèse déjà formulée par nous du siège intraleucocytaire de l'agent inconnu du typhus exanthématique.

III. — Une inoculation de virus actif quelle qu'en soit l'origine (piqûres de poux dans nos expériences antérieures, sang dans nos expériences de l'an passé et de cette année, plasma virulent, etc.) communique aux animaux qu'il infecte une immunité rapide et durable.

L'inoculation d'un virus insuffisamment actif (sang à doses trop faibles ou chauffé, etc.) ou d'un produit lui-même avirulent provenant d'un malade (globules rouges lavés, liquide céphalo-rachidien) ne donne aucune immunité; qu'il y ait eu à la suite de l'inoculation infection avortée, comme cela peut se voir dans le premier cas, ou absence de tout symptôme, ainsi que cela se passe toujours dans le second.

Deux singes infectés, traités par l'injection d'un sérum de convalescents actif et un singe non vacciné contre une infec-



tion expérimentale ultérieure par l'injection préventive d'un sérum insuffisamment efficace, ont acquis et conservé à la suite de leur maladie expérimentale une immunité solide. Un singe, protégé efficacement contre la maladie expérimentale par l'inoculation d'un sérum de convalescents suffisamment actif, n'a pas acquis l'immunité.

La loi générale que nous formulons l'an passé conserve toute sa valeur. Seule, une infection sévère confère à coup sûr l'immunité contre le typhus exanthématique.

IV. — Le mouton, la chèvre, l'âne, le chien, le lapin, la poule sont naturellement réfractaires à l'inoculation expérimentale du virus.

V. — Le sérum de convalescents, recueilli dans les premiers jours après la défervescence, c'est-à-dire à l'époque où ses propriétés préventives sont le plus développées (Cf. nos expériences de l'an passé) ne donne aucun résultat appréciable pour le traitement de l'homme malade. Il n'agit ni sur la fièvre, ni sur le pouls; la durée et l'évolution de l'infection ne sont nullement modifiées; peut-être les symptômes nerveux et l'état général en tirent-ils un léger avantage, mais ce résultat est incertain et nullement en rapport avec les difficultés presque insurmontables qu'offre l'application de ce traitement.

Le salvarsan est inactif et dangereux; l'émétique inactif.

L'adrénaline n'empêche pas la baisse de la pression artérielle; elle se montre sans action sur la fièvre et la durée de l'infection. Il ne semble pas d'ailleurs que le virus exanthématique affecte d'une façon spéciale les capsules surrénales.

Les abcès de fixation diminuent peut-être la fréquence des complications secondaires.







## RECHERCHES SUR LA TRICHINOSE (1)

par M. ROMANOVITCH

(Travail du laboratoire de M. Weinberg, à l'Institut Pasteur.)

(Avec la Pl. V).

La littérature médicale est très riche en travaux sur la trichinose : des savants des plus éminents se sont attachés à l'étude de cette helminthiase; quelques-uns de leurs travaux font époque et cependant, bien que le mémoire remarquable d'Askanazy date de 1893, on peut encore aujourd'hui répéter après cet auteur, qu'il reste encore beaucoup de points à élucider, surtout parce que ces travaux n'ont pas suffisamment porté sur le côté expérimental de la question.

Ainsi l'étude des points les plus importants : rôle des microbes dans les différents états morbides observés chez les animaux et les sujets trichinés, action toxique des larves de *Trichine* sur l'organisme infesté, sort des larves dans l'épaisseur même des organes parenchymateux où elles doivent nécessairement être amenées par le courant sanguin, immunité de quelques espèces animales à l'infection par la *Trichine*, enfin, diagnostic précoce et traitement de la maladie, manquent encore de bases expérimentales sérieuses.

C'est pour répondre à quelques-unes de ces questions que nous avons exécuté, au cours de ces deux dernières années, un grand nombre de recherches dont nous allons brièvement exposer les résultats.

Nos expériences ont porté exclusivement sur le rat et le cobaye.

(1) A. RAILLET établit que le nom de *Trichinella* doit remplacer celui de *Trichine* antérieurement réservé à un genre d'insectes. La *Trichine* doit donc s'appeler *Trichinella spiralis* (RAILLET. Quelques rectifications à la nomenclature des parasites. *Rec. de méd. vét.*, 1896, p. 161). Depuis, les parasitologistes ont admis ce terme (BLANCHARD. *Traité de pathologie générale* publié par Ch. BOUCHARD, t. II, p. 761). Par conséquent, nous devrions dire *Trichinellose* comme le propose Stäubli; mais ce terme n'est pas encore employé assez couramment pour que nous croyions devoir délaïsser l'ancienne terminologie dont nous nous sommes servis dans nos articles antérieurs.

PONTE DE LARVES DE TRICHINE ET LEUR DISTRIBUTION DANS  
L'ORGANISME INFESTÉ.

Askanazy et Cerfontaine, simultanément (1891-1893), ont fait une découverte fondamentale dans l'étude de la trichinose, à savoir que les femelles de Trichine fécondées s'introduisaient, pour pondre, dans la muqueuse de leur hôte et notamment dans les vaisseaux lymphatiques. Les larves ainsi pondues dans l'intérieur même de ces vaisseaux sont ensuite entraînées par le courant lymphatique. Cette découverte a permis d'expliquer pourquoi les larves n'ont jamais été trouvées libres dans le tube digestif de l'animal infesté, sauf dans deux ou trois cas où elles ont été rencontrées en nombre insignifiant.

L'absence de larves libres dans le tube digestif de l'hôte n'empêchait cependant pas, pendant longtemps, les parasitologistes de prétendre que la femelle de Trichine fait sa ponte dans le canal même de l'intestin.

Actuellement, il est admis que les femelles de Trichines s'enfoncent dans les villosités de l'intestin, s'introduisent entièrement ou seulement par la partie antérieure de leurs corps dans l'espace lymphatique central des villosités mêmes ou bien dans les vaisseaux lymphatiques plus profonds de la muqueuse et même dans la sous-muqueuse comme Askanazy l'a observé une seule fois.

D'après Cerfontaine, la pénétration de Trichines dans la sous-muqueuse serait un fait banal.

Pour notre part, nous pouvons affirmer, en nous appuyant sur de nombreuses recherches personnelles, que la Trichine ne dépasse jamais la *muscularis mucosæ*.

Les dessins 1 et 2 montrent les endroits où l'on retrouve le plus souvent ces vers. Tantôt la Trichine (fig. 1) se loge dans le cul-de-sac glandulaire qu'elle dilate et distend parfois d'une façon considérable. On voit en *a* le cul-de-sac ainsi déformé perdre la plupart de ses cellules épithéliales; les cellules conservées sont atrophiées et devenues, pour la plupart, cubiques.

Très souvent on retrouve la Trichine dans l'intérieur du vaisseau lymphatique central de la villosité, comme le montre la figure 2. Le ver est représenté en *a* et *a'*. Ce dessin est caracté-

ristique. On s'y rend bien compte que le vaisseau lymphatique dilaté au niveau où loge la Trichine, reprend plus haut son calibre normal.

On comprend donc que les larves pondues par la Trichine soient facilement emportées par le courant lymphatique de la villosité vers les organes profonds.

Les cellules endothéliales du vaisseau lymphatique qui loge

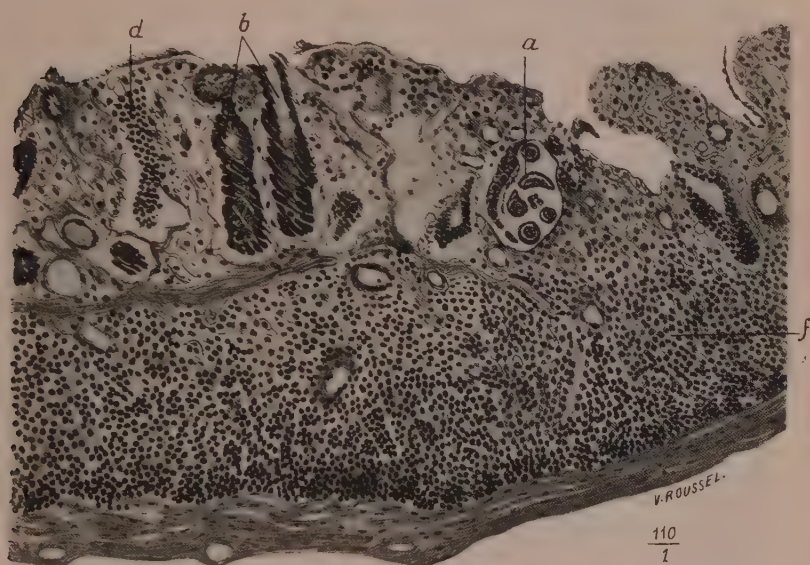


FIG. 1. — Coupe d'intestin d'un rat trichiné.

*a*) Cul-de-sac très dilaté d'une glande de Lieberkühn montrant dans son intérieur de nombreuses sections d'une Trichine adulte; *b*, *c*) glandes de Lieberkühn; *d*) capillaire lymphatique du chorion rempli de leucocytes; *f*) sous-muqueuse infiltrée par des leucocytes.

le parasite souffrent de la présence de la Trichine. Elles sont souvent hypertrophiées (fig. 2, *b'*). Elles montreraient même parfois d'après Askanazy, des figures de karyokinèse, ce que nous n'avons pas trouvé dans nos préparations.

Par contre, nous avons trouvé très souvent et en grand nombre des cellules épithéliales en karyokynèse, et cela aussi bien au voisinage des vaisseaux lymphatiques parasités qu'à une certaine distance de ces derniers.





FIG. 2. — Coupe d'intestin grêle d'un cobaye trichiné.

Légende de la figure 2.

Cette préparation montre très nettement la pénétration d'une femelle de Trichine (*a*, *a'*) dans le vaisseau lymphatique très dilaté (*c*). Dans la partie profonde, ce vaisseau reprend son calibre normal (*c'*). Une glande de Lieberkühn, au voisinage du vaisseau parasité, montre un grand nombre de cellules en karyokynèse (*d*).

La figure 2 montre en *d* un grand nombre de ces cellules en mitose.

Askanazy, qui a aussi constaté quelquefois, mais plutôt rarement, la karyokinèse des cellules des glandes de Lieberkühn, considère ce phénomène comme normal.

Pour nous, cette multiplication des cellules épithéliales est certainement en rapport avec la destruction des cellules glandulaires et de celles de revêtement, qui est si intense dans la trichinose. Notre façon de voir est corroborée par les observations de Ziegler (1), qui a constaté que la division du noyau et de la cellule ne s'effectue pas seulement au niveau de la perte de substance, mais aussi à une certaine distance. Dans l'intestin, la perte des cellules épithéliales superficielles est compensée par la multipli-

(1) ZIEGLER, *Lerbuch der allgemeine Pathologie und der pathologische Anatomie*. Iena, 1901, volume I, p. 302.

cation des cellules se trouvant au fond des glandes de Lieberkühn.

Nous n'avons pas à décrire ici les lésions anatomo-pathologiques qu'on trouve dans l'intestin, au niveau de l'infection par la Trichine; disons seulement que la nécrose et la destruction en masse des cellules épithéliales de revêtement, qui provoque la multiplication de l'épithélium profond, va presque toujours de pair avec l'abrasion de la partie superficielle d'un grand nombre de glandes de Lieberkühn, avec l'hyperémie de toutes les parois ainsi qu'une infiltration inflammatoire qui ne dépasse généralement pas la sous-muqueuse.

Les larves pondues dans l'intérieur des lymphatiques suivent la voie de ces vaisseaux et gagnent ensuite le courant circulatoire. Trouvées pour la première fois dans le sang par Zenker (1), puis par Bouchard et Magnan (2), elles y ont été recherchées d'une façon systématique par Staubli (3). Pour ce dernier, les larves de Trichine apparaissent dans le sang sept jours après l'infection. Nous les y avons quelquefois trouvées dès le cinquième jour; mais en général elles apparaissent dans le sang du cobaye le sixième jour et ne le quittent guère que le vingtième. Chez le rat, elles disparaissent du sang plus tôt (le seizième jour).

Une des meilleures techniques de recherches des larves dans le sang est celle employée par Staubli. Elle consiste à recevoir le sang dans de l'eau acidulée. Nous prélevions du sang par ponction du cœur.

Nous avons aussi obtenu de bons résultats en mélangeant le sang à de l'eau distillée (à parties égales). Ce mélange est centrifugé et le culot obtenu est examiné au microscope.

En général, une goutte de culot montre 2 à 7 larves. Les larves ainsi obtenues sont parfaitement vivantes, mobiles, et ne sont nullement endommagées par les manipulations qu'on leur a fait subir.

Un certain nombre de larves ne suivent pas le courant circulatoire mais, nées dans l'épaisseur de la muqueuse, en dehors

(1) Cité par DAVAINÉ, *Traité des Entozoaires*, p. 747.

(2) *Ibidem*.

(3) STAUBLI, Beitrag zur Kenntniss der Verbreitungsart der Trichinenembryonen. *Vierteljahrsschr. d. Natur. — Gesellsch. in Zürich*, vol. L, 1905, p. 163.

des vaisseaux lymphatiques, elles peuvent gagner de proche en proche, par mouvement actif, la cavité abdominale où elles ont été trouvées par plusieurs auteurs (Leuckart, Staübli, Askanazy et nous-même). Nous avons aussi constaté leur présence dans la cavité pleurale; Leuckart les a aussi trouvées dans la cavité du péricarde.

Comment expliquer la présence de larves dans la cavité pleurale et péricardique?

L'hypothèse la plus plausible est qu'elles y viennent en traversant les vaisseaux sous-séreux où elles sont entraînées par le courant lymphatique. Nous en voyons une preuve dans l'observation d'Askanazy (1) qui a trouvé des larves sous la plèvre de l'animal infesté.

D'autre part, on peut également admettre qu'un certain nombre d'entre elles vient directement du poumon et du cœur. Amenées dans les capillaires de ces organes et ne pouvant s'y développer, elles les traversent de proche en proche jusqu'à ce qu'elles tombent dans la plèvre ou le péricarde. C'est probablement pour cette raison qu'on ne les trouve pas dans le poumon ni dans le foie.

Arrivées dans une de ces cavités séreuses, les larves de Trichine n'y trouvent pas un milieu favorable pour leur développement.

On sait que les helminthes égarés dans un endroit de l'organisme qui ne leur convient pas, périssent rapidement. Il se forme autour d'eux une paroi inflammatoire qui ne tarde pas à se calcifier, comme c'est le cas pour les Filaires (*Filaria équina* et *Filaria labiato-papillosa*).

Il en est ainsi de la *Fasciola hépatica* égarée dans les poumons où l'on trouve souvent, à sa place, une poche à parois fibreuses infiltrée de sels calcaires et remplie d'une bouillie couleur chocolat, dans laquelle on ne trouve parfois que quelques débris du parasite.

On peut donc supposer que les larves de Trichine étant de structure beaucoup moins compliquée que les Helminthes adultes, se dissolvent entièrement, sans laisser de traces,

(1) ASKANAZY, Zur Lehre von der Trichinosis. *Virchow's Archiv*, 1895, vol. CXLI, p. 54.



lorsqu'elles arrivent dans les cavités séreuses où elles ne trouvent pas les éléments nécessaires à leur nutrition.

Pour en avoir une preuve, nous avons pratiqué l'expérience suivante :

Nous avons injecté dans la cavité péritonéale d'un cobaye un grand nombre de larves parfaitement vivantes recueillies dans le péritoine, ou dans la plèvre d'autres cobayes ou bien encore isolées de leur sang.

Deux semaines après, nous n'avons pu, chez le cobaye ainsi traité, trouver de traces des larves, ni dans sa cavité péritonéale ni dans les muscles. Il est évident que toutes les larves injectées dans la cavité péritonéale se sont complètement dissoutes.

Les larves apportées par le courant sanguin dans les muscles, s'y installent définitivement et s'y développent jusqu'à ce qu'elles arrivent à l'état adulte asexuel.

Les savants allemands ont admis depuis longtemps que les larves de Trichine pénètrent à l'intérieur même des faisceaux primitifs de la fibre musculaire (Virchow, Lévin, Ehrhardt, Staübli et d'autres).

En France, depuis Chatin, en dépit des affirmations contraires de Davaine, il est très répandu que les larves en question s'arrêtent dans le tissu conjonctif interfasciculaire et que leur pénétration à l'intérieur du faisceau primitif est très rare. Durante (1), n'admettant pas cette manière de voir, fait néanmoins une concession partielle à la thèse de Chatin (2) : « La substance striée paraît être l'aliment de prédilection de la larve. Cependant la trichine peut évoluer en dehors du muscle, puisqu'on l'a retrouvée dans le tissu adipeux et dans les tendons. »

Durante a tort de faire cette concession. Si l'on trouve quelques larves dans le tissu conjonctif, il s'agit de parasites égarés. La substance striée de la fibre musculaire n'est pas seulement l'aliment de prédilection de la larve de Trichine ; elle est son aliment unique. Pour en user, la larve doit posséder la propriété spéciale de dissoudre le myoplasme du faisceau primitif.

Nous n'avons pu mettre en évidence cette propriété dans des expériences *in vitro* ; cependant, nous sommes conduits à l'admettre par des constatations histologiques. En effet, aussitôt

(1) CORNIL et RANVIER, *Manuel d'Histologie pathologique*, vol. II, p. 387.

(2) CHATIN, *La Trichine et la Trichinose*, Paris, 1883.

que la larve s'installe dans une fibre musculaire, on y constate une désagrégation du faisceau primitif; les stries disparaissent et laissent à leur place une masse amorphe, et cela dans des fibres où l'on ne trouve pas du tout le phénomène observé par Soudakévitch (1).

Si l'on veut avoir une preuve certaine que la larve de Trichine pénètre bien dans le faisceau primitif de la fibre musculaire et y suit son développement, il faut étudier les coupes histologiques des muscles dès le début de leur infestation par les parasites.

La planche jointe à ce travail ne laisse pas de doute sur ce point. On voit en *a* (Pl. V, fig. 1) une larve qui n'a pénétré qu'à moitié dans la fibre musculaire. La figure 2 est plus nette encore, car ici, la larve est représentée dans toute sa longueur, ayant pénétré complètement; elle y est depuis peu de temps (1), parce que la striation de la fibre est encore tout à fait intacte.

La démonstration décisive est apportée par la figure 4 qui montre des cellules musculaires coupées transversalement. On y voit que la coupe du parasite se trouve en plein myoplasme.

#### INFECTIONS MICROBIENNES DANS LA TRICHINOSE.

La lésion qui frappe surtout à l'examen d'une coupe d'intestin d'animal infesté récemment par la Trichine est certainement, comme nous l'avons déjà dit plus haut, la perte d'épithélium de recouvrement sur une grande étendue de la muqueuse; de sorte que la porte reste grande ouverte à tous les microbes de la flore intestinale. Heureusement, bon nombre de ceux-ci sont détruits dans l'estomac et les bactéries arrivant dans la première moitié de l'intestin grêle, peut-être aussi en grande partie affaiblies, y périssent vite; la plupart d'entre elles ne sont, d'ailleurs, pas pathogènes.

S'il n'en était pas ainsi, l'infection bactérienne se produirait toujours et dès les premiers jours de l'infection.

L'idée que la Trichine favorise l'infection microbienne est déjà ancienne; déjà en 1877, Piana (2) avait émis cette hypo-

(1) SOUDAKÉVITCH, Modifications des fibres musculaires dans la trichinose. *Annales de l'Institut Pasteur*, 1892.

(2) Cité par NEUMANN, *Maladies parasitaires non microbiennes*.

thèse. Friedreich (1) a observé, le premier, chez un malade atteint de trichinose, une série d'abcès sous-cutanés dont l'un renfermait une Trichine. Comme il a appris plus tard que cette complication n'est pas rare dans la trichinose, il a admis l'existence de pustulose et de furonculose trichinées.

D'après ce savant, les larves émigreraient des muscles pour aller se loger dans le tissu sous-cutané où elles provoqueraient la production du pus. Staübli s'oppose à cette manière de voir. Pour lui, la Trichine se trouve dans l'abcès d'une façon toute accidentelle, étant mise en liberté par une fibre musculaire détruite par la suppuration. Staübli (2) n'a pas trouvé de larves de Trichine dans les abcès profonds d'un malade qu'il soignait pour la trichinose. Par contre, il a isolé un staphylocoque du pus d'un abcès; le sang et l'urine du même malade renfermaient un streptocoque, c'est à ce microbe qu'il attribue la formation d'abcès. Ce savant a également trouvé une infection bactérienne dans deux cas de trichinose expérimentale.

Comme les larves de la Trichine sont rejetées par cette dernière dans les vaisseaux lymphatiques de la muqueuse, il est évident qu'elles restent stériles et qu'elles ne peuvent pas porter de microbes dans les muscles. Nous en avons, en effet, cherché en vain dans les coupes sériees de muscles masticateurs, muscles de diaphragme, etc..., de rats trichinés sacrifiés à différentes périodes de l'infestation; nous n'avons trouvé de microbes qu'une fois dans les muscles d'un rat autopsié seulement vingt-quatre heures après la mort. Si les larves ne provoquent pas d'infection microbienne, la Trichine, qui traverse la muqueuse toute souillée de microbes, les sème sur son passage. L'examen histo-bactériologique le montre nettement.

Nous avons pratiqué desensemencements du sang de 23 rats sacrifiés à différentes périodes de l'infestation (de sept à vingt-cinq jours, une fois quarante-huit jours après l'ingestion de viande trichinée). Treize fois nous avons obtenu des colonies microbiennes. Six autres rats tués au moment de l'agonie ont donné des cultures. Il en est de même pour 7 rats trichinés morts trois à sept jours après l'infestation et autopsiés aussitôt après leur mort.

(1) Cité par STAUBLI, *Trichinosis*. Wiesbaden, 1909, p. 141.

(2) *Loc. cit.*, p. 141-142.



Sur dix cobayes trichinés, sept fois le sang a donné des cultures. Nous avons également obtenu des résultats positifs en ensemençant, immédiatement après la mort, le sang de 4 cobayes trichinés.

Le plus souvent, cesensemencements ont donné des colonies de plusieurs microbes différents (Microbes isolés : coli-bacille, streptocoque, staphylocoque, un bacille aérobie mobile avec spore terminale et ovoïde, prenant le Gram et liquéfiant la gélatine, *b. subtilis*, *b. mesentericus* anaérobie facultatif (n. es.) un bacille rappelant la bactériidie charbonneuse et le *b. perfringens* (3 rats d'égouts), un diplocoque anaérobie ne prenant pas le Gram (cobaye).

Depuis la publication de nos notes préliminaires sur la Trichinose, nous avons pris connaissance d'un travail de H. Raebiger (1) qui, poursuivant ses recherches parallèlement aux nôtres, a abordé également la question de l'infection microbienne dans la trichinose. Ce savant a réussi à isoler du sang du cœur et des organes, dans 11 cas sur 111 rats trichinés, une bactérie du groupe paratyphique. Mais comme, d'une part, des rats, infestés par la Trichine, dont le sang était stérile, périssaient dans la même proportion que ceux atteints de septicémie et que, d'autre part, les lésions anatomo-pathologiques étaient trouvées identiques pour les deux séries de rats, Raebiger conclut que la présence de microbes dans le sang de rats trichinés est sans aucune influence sur le cours de la trichinose.

Tout en admettant que la Trichine puisse amener, surtout dans l'infection massive, des lésions intestinales et musculaires assez graves pour provoquer par elles-mêmes, sans intervention microbienne, une mort assez rapide, nous ne pouvons accepter la conclusion de ce savant. D'abord, nous ne connaissons pas la virulence exacte du microbe isolé par lui; de plus, l'hémoculture négative n'exclut pas nécessairement une infection microbienne.

Nous restons, au contraire convaincu, en nous basant sur les recherches publiées par quelques auteurs et sur les résultats de nos propres expériences, que la fièvre, l'hypertrophie de la

(1) H. RAEBIGER. Untersuchungen über die Trichinenkrankheit. *Zeitsch. f. Infektionskr. der Haustiere*, 1911, vol. IX, f. 1-2, p. 144.

rate, les abcès, et, quelquefois, le décès qu'on observe chez l'homme atteint de trichinose, sont dus à des microbes envahissant l'organisme à la faveur des lésions de la muqueuse provoquées par le parasite.

#### ACTION TOXIQUE DES LARVES DE TRICHINE.

On a pensé depuis longtemps à l'action toxique des larves de Trichine. C'est Ehrhardt Oskar (1) qui a, le premier, nous semble-t-il, attribué la dégénérescence des faisceaux musculaires voisins de ceux envahis par la larve de Trichine, à l'action des substances toxiques élaborées par le parasite.

Metchnikoff (2) se prononce également en faveur de cette hypothèse. « Le tableau morbide (dans la trichinose) est plus compliqué que dans la gale et permet de supposer une action complémentaire des excréta de la larve dans la production de l'état fébrile et de certains phénomènes généraux. »

Pour Durante (3), ce parasite agirait à la fois et comme corps étranger et par les toxines qu'il sécrète. Il pense que « l'on peut attribuer à l'action locale des toxines sécrétées par le parasite, les phénomènes de dégénérescence (dégénérescence cireuse et désintégration granuleuse) limités à une petite étendue. Le foie, de volume normal, est presque toujours atteint d'une dégénérescence grasseuse que l'on peut attribuer au passage des toxines trichineuses, toxines très actives qui, dans les cas graves, sont susceptibles de donner naissance à de l'albuminurie ».

V. Linstow (4) croit que les convulsions, la parésie des membres et les accidents mortels, qu'on observe quelquefois dans la trichinose, sont dus à l'action toxique des larves. Babès (5) a trouvé des lésions chroniques du myocarde et du rein chez un individu infesté depuis vingt et un an par les larves de trichine.

(1) EHRHARDT (OSKAR), Zur Kenntniss der Muskelveränderungen bei der Trichinose der Kaninchens. *Beitrag. z. pathol. Anat. und z. allgem. Pathol.*

(2) E. METCHNIKOFF, *L'immunité dans les maladies infectieuses*, 1901, p. 4.

(3) *Loc. cit.*, p. 384, 388 et 402.

(4) V. LINSTOW, Die durch tierische Parasiten erzeugten toxischen Stoffe. *VIII<sup>e</sup> Congrès international de médecine vétérinaire, Budapest, 1905.*

(5) *Centralblatt für Bakteriol.*, vol. XLII, 1908.

L. Opalka (1) cite, dans son travail sur la trichinose, 28 cas de trichinose de l'homme; dans 10 cas, on a constaté des lésions du cœur, du foie ou des reins.

H. M. Höyberg (2) a expérimenté avec le sérum d'animaux trichinés. Injecté à des animaux neufs, ce sérum ne s'est pas montré toxique. L'auteur en tire la conclusion que le sérum d'animaux récemment infestés par la Trichine ne renferme pas de toxine.

Les expériences de Höyberg ne nous ont pas convaincu. Nous avons, en effet, très souvent constaté, à l'autopsie des animaux (rats et cobayes) morts de trichinose, la présence de lésions des reins et des capsules surrénales qui ne pourraient être toujours attribuées à l'infection bactérienne, l'ensemencement du sang sur milieux aérobies et anaérobies ayant souvent donné des résultats négatifs. D'autre part, il nous semble impossible d'expliquer, par la simple action mécanique, les lésions de fibres musculaires. Il faut donc penser à la toxicité des produits d'échange des larves de Trichine.

Ainsi donc, malgré les expériences de Höyberg, nous persistons à penser que, si les larves de Trichine sécrètent des substances toxiques, ces dernières doivent se trouver à un moment donné dans le sérum de l'animal infesté.

Pour vérifier cette hypothèse, nous avons étudié d'une façon systématique la toxicité du sérum des cobayes et des rats infestés par la Trichine.

Ces recherches nous ont permis de constater que le sérum de ces animaux acquiert vraiment des propriétés toxiques et que cette toxicité peut déjà apparaître neuf jours après l'ingestion de viande trichinée; on la retrouve jusqu'à un mois et demi après l'infestation. Ces sérums se sont montrés toxiques aussi bien pour d'autres cobayes que pour des rats; autrement dit: ils étaient en même temps iso et hétérotoxiques.

Ces expériences portent sur le sérum de quatorze cobayes; huit fois, le sérum s'est montré très toxique. Les sérums peu toxiques proviennent des cobayes chez lesquels on n'a trouvé

(1) L. OPALKA, Beitrag zur Vorkommen der Trichinen bei Menschen. *Thèse de Berlin*, 1904.

(2) H. M. HÖYBERG, Bilden sich bei Trichinose toxische Stoffe. *Zeitsch. f. Tier. Med.*, vol. X, 1907, p. 1.



à l'autopsie qu'une faible infection par les larves de trichine.

Nous avons éprouvé nos sérums par des injections sous-cutanées à des cobayes et des rats neufs, à la dose de 4 et 6 centimètres cubes par kilogramme d'animal (1).

À la suite d'une seule injection, ces animaux étaient pris d'abattement, de tremblement, de bâillements (surtout les rats), de contractions incessantes des muscles masticateurs. Ils présentaient en même temps de la dyspnée, de la diarrhée et de l'amaigrissement. La mort survenait parfois rapidement, parfois au bout d'un temps assez prolongé ; dans deux cas, le lendemain ; dans un troisième cas, au bout de trois jours ; dans un quatrième, cinq jours ; dans un cinquième, six jours ; dans un sixième, onze jours ; dans un septième, au bout de vingt-cinq jours. Dans un cas, les deux cobayes, après avoir manifesté des troubles graves se sont rétablis après quelque temps.

On pouvait supposer que les phénomènes graves que l'on observe lorsqu'on injecte à des cobayes neufs du sérum de cobayes parasités sont dus, tout simplement, à la présence d'isohémolysines. Il n'en est rien ; nous avons en effet recherché des isohémolysines dans un grand nombre de sérums trichinés, mais toujours sans résultat.

Les animaux morts à la suite de l'injection du sérum toxique ont toujours présenté les mêmes lésions, que la mort survint rapidement, ou bien au bout d'un temps plus ou moins long : hémorragie de l'intestin, surtout de l'intestin grêle ; hyperémie intense des vaisseaux de la cavité abdominale, cavités du cœur, dilatées et gorgées de sang.

Nous avons observé, en outre, chez quelques-uns de ces animaux, des pétéchies sous-péritonéales et des pointes hémorragiques dans les poumons. Les animaux qui survivent à

(1) Rappelons à ce propos les recherches de Vallardi (*Folia serologica*, 1911, pp. 879-882) sur l'isotoxicité du sérum de cobaye. On recueille le sérum après avoir fait séjourner le sang une heure à l'étuve et quatre heures à la glacière. Dans ces conditions, le sérum de cobaye n'est pas isotoxique, même injecté à la dose de 2 à 6 cent. cubes à des cobayes de 200 grammes.

M. Wassermann et F. Keysser (*Zeitschr. f. Hygiène*, 1911) mentionnent incidemment que le sérum de cobaye recueilli deux heures après la saignée de l'animal est isotoxique.

Tous ces faits ne font que confirmer l'interprétation que nous avons donnée des résultats de nos expériences : l'injection de cobayes neufs a été toujours pratiquée le lendemain de la saignée d'animaux trichinés. De plus, nous avons fait des injections sous-cutanées et non pas intraveineuses.

l'injection de sérum présentent, au bout de quelques jours, une maigreur extrême.

Nous avons déjà dit plus haut que la toxicité du sérum de cobayes ou de rats trichinés est en rapport avec l'intensité de l'infestation larvaire. D'autre part, la sensibilité des animaux à ces substances toxiques est inégale, individuelle. Ainsi, il nous est arrivé quelquefois de ne tuer, avec la même dose de sérum, qu'un cobaye sur deux.

En général, le sérum n'est plus toxique six semaines après l'infestation. Une fois cependant nous avons constaté cette toxicité deux mois et demi après l'ingestion de viande trichinée.

Le sérum de rats infestés par la Trichine s'est montré également iso et hétéro-toxique. Les rats neufs injectés avec ce sérum ont présenté les mêmes symptômes que ceux décrits plus haut pour les cobayes. La mort survenait de vingt-quatre heures à vingt jours après l'injection.

L'injection préalable d'un sérum faiblement toxique peut rendre plus grave l'infestation ultérieure par la viande trichinée.

En voici un exemple :

Un rat reçoit en injection sous-cutanée 1 cent. cube  $\frac{1}{4}$  d'un sérum provenant d'un autre rat faiblement infesté par la Trichine. Il est malade pendant quelques jours, puis se remet et paraît se porter très bien.

Quelque temps après, il est nourri avec de la viande trichinée. L'ingestion de cette viande trichinée n'est suivie d'aucun trouble important. Or, quarante-quatre jours après l'injection de sérum faiblement toxique, ce rat meurt. Nous n'avons pas trouvé à son autopsie de lésions de trichinose intestinale. Par contre, son cadavre présentait toutes les lésions que nous avons décrites plus haut chez les animaux injectés avec un sérum très toxique.

Il est évident que, dans ce cas, l'action du sérum faiblement toxique, qui par lui-même n'était pas capable de provoquer la mort de l'animal, a été renforcée par l'apport d'une nouvelle toxine sécrétée par les larves provenant de l'ingestion de viande trichinée.

Nous avons pu étudier l'urine de trois cobayes trichinés. Les trois cobayes neufs injectés sous la peau avec 1 cent. cube  $\frac{1}{4}$  à 2 cent. cubes  $\frac{1}{2}$  d'urine ont succombé au bout de deux, trois et sept jours.

En résumé, le sérum d'un certain nombre de cobayes et de

rats trichinés s'est montré en injections sous-cutanées nettement iso et hétérotoxique.

Cette toxicité n'existe que dans le sérum des animaux très fortement infestés ; elle apparaît en général neuf jours après l'infection et ne dure le plus souvent que cinq à six semaines.

Les substances toxiques dues à la présence des larves sont éliminées par les reins : ainsi, dans trois cas, où l'on a pensé à éprouver la toxicité de l'urine, cette dernière a provoqué des symptômes très graves chez les cobayes auxquels elle a été injectée.

#### RECHERCHES D'ANTICORPS SPÉCIFIQUES DANS LE SÉRUM D'ANIMAUX INFESTÉS.

Nous avons fort peu d'éléments pour faire le diagnostic précoce de la trichinose. L'éosinophilie apparaît bien vers le huitième jour après l'infestation, mais elle n'a rien de spécifique et ne peut servir d'indication que lorsqu'on a éliminé toutes les autres causes capables de la provoquer.

L'examen microscopique d'un petit morceau de muscle ne peut guère être utile que dans les cas d'infection très grave ; il ne donnera rien dans les cas moyens ni dans les cas légers dans lesquels les larves n'ont envahi que les muscles du diaphragme et du larynx.

Un renseignement de très grande importance peut être apporté par la recherche directe des larves dans le sang circulant. Pour arriver à un résultat, il est indispensable de suivre le malade aussitôt après l'ingestion de viande suspecte et de pratiquer l'examen de son sang d'une façon systématique et quotidiennement.

Nous avons indiqué plus haut la bonne technique à suivre. Chez l'homme, on pourra recueillir du sang au doigt, au lobule de l'oreille ou bien directement dans la veine du bras.

Comme les larves de *Trichine* élaborent des produits toxiques, nous nous sommes demandé si l'animal infesté réagit à la résorption de ces toxines par l'élaboration d'anticorps spécifiques. S'il en était ainsi, il serait facile d'utiliser la recherche de ces anticorps pour le diagnostic de la trichinose.

Nous avons recherché la présence d'anticorps spécifiques



dans le sérum d'animaux trichinés par la méthode de fixation du complément, ainsi que par celle des précipitines.

Comme antigène, nous avons utilisé l'extrait aqueux de muscles farcis de larves. Les morceaux de muscles broyés dans l'appareil Latapie sont triturés dans un mortier avec du verre pilé et une petite quantité d'eau physiologique. Le produit de broyage est placé pendant deux heures à l'étuve à 37 degré, puis à la glacière jusqu'au lendemain. On passe ensuite à travers une toile fine et on filtre sur du papier Chardin.

Nos recherches ont porté sur le sérum de trois rats et trois cobayes, infestés depuis huit à quinze jours. La précipito-réaction ainsi que la déviation du complément ont donné des résultats négatifs. Et cependant, dans nos expériences de fixation du complément, nous avons employé notre antigène à la dose de 0,1, 0,2. cent. cube, alors que 0,4 d'antigène fixaient par eux-mêmes le complément.

Ströbel (1), qui a également recherché des anticorps dans la trichinose, prétend avoir obtenu des résultats satisfaisants en opérant avec le sérum d'animaux et d'hommes infestés depuis plusieurs mois.

Il a préparé son antigène en traitant du muscle trichiné par une solution forte de soude caustique et d'antiformine.

En expérimentant ainsi avec les sérums humains, il a obtenu une fixation nette avec 0,3 cent. cubes d'antigène, alors que 0,4 cent. cubes fixaient seuls le complément. D'autre part, les sérums de lapin ont donné des résultats très variables. Nous ne pouvons donc accepter les conclusions de Ströbel qu'avec une grande réserve.

Quelques espèces animales, comme le cheval, le bœuf, le mouton et les oiseaux, présentent une certaine immunité naturelle contre l'infestation par les larves de Trichine. Si on les force à avaler de la viande trichinée, on constate que les larves de Trichine se développent bien dans leur intestin et y atteignent leur maturité sexuelle; et cependant, on ne trouve pas chez ces animaux d'infestation musculaire.

On s'est demandé, s'il était possible de conférer aux animaux cette résistance à l'infection par les larves de trichine, par une

(1) STRÖBEL, Die Serodiagnostik der Trichinosis. *Münch. med. Wochens.*, 1914, 43, p. 672.

infestation préalable. Cependant, les observations de Rupprecht (1) et d'autres, chez l'homme, des recherches expérimentales d'Askanazy et de Staübli ont démontré que les animaux guéris de trichinose peuvent subir une réinfection.

Nous avons observé des cas de réinfection spontanée chez dix rats blancs. Ces derniers étaient gardés dans des bocaux avec d'autres rats trichinés; ils se sont réinfectés en dévorant leurs compagnons morts dans la nuit. La réinfection était si intense que les rats mouraient trois ou quatre jours après le repas infestant. Une partie des animaux se sont réinfectés trente jours après l'infestation; une autre partie au bout de deux mois.

Nous avons aussi fait quelques recherches sur le traitement de la trichinose. Les médicaments antihelminthiques sont incapables de débarrasser l'intestin des femelles de *Trichine* fécondées, et cela pour la simple raison que ces dernières sont logées dans l'épaisseur même de la paroi intestinale. Nous avons pensé qu'il serait peut-être possible d'agir sur les embryons au moment où ils ont pénétré dans le courant circulatoire. Nous avons essayé l'effet de l'émétique et du 606.

Staübli avait fait aussi quelques essais avec l'atoxyl et l'arsacétine. La plupart des animaux traités avec ces produits sont morts au bout de quinze à trente jours. Cet auteur a remarqué un certain ralentissement dans le développement des embryons.

Pour la première série de nos expériences, nous avons préparé une solution d'émétique à 1/500. Des cobayes infestés le 25 mai ont été traités par une série d'injections (le 3, le 5, le 6, le 7, le 8, le 10, le 12, le 18 et le 25 juin); à chaque injection, ils recevaient dans la peau 0,02 d'émétique par kilogramme de leur poids.

Pas un des cobayes traités n'a évité l'infection musculaire. Chez tous, nous avons retrouvé des larves, soit dans les muscles, soit dans le sang. Il faut cependant remarquer que nous n'avons pas trouvé de larves enkystées dans les muscles d'un cobaye mort trente-trois jours après l'infestation, et que très peu de larves commençaient à s'enrouler. Un cobaye a survécu; sacrifié trois mois après le traitement par l'émétique, il a montré des larves enkystées.

Cinq rats nourris de viande trichinée, le 7 juillet, ont reçu sept injections sous-cutanées d'émétique (1,5 milligrammes par injection), du 12 au 20 juillet.

(1) Cité par Staübli.

Deux rats sont morts le 24 juillet, avec de la trichinose musculaire ; par contre, nous n'avons pas trouvé de larves de Trichine ni dans le diaphragme, ni dans les muscles masticateurs chez le cinquième rat mort dix jours après l'infestation.

Nous avons également traité cinq cobayes avec du 606 que le professeur Ehrlich a eu l'extrême obligeance d'envoyer à M. Weinberg. Les cobayes ont été injectés quatre fois en l'espace de huit jours, à raison de 0,02 à 0,04 par kilogramme de leur poids. Tous ces animaux sont morts ou ont été sacrifiés neuf à seize jours après l'infestation. Leurs muscles étaient déjà envahis.

En résumé, nous n'avons réussi, dans nos essais de traitement, qu'à ralentir quelquefois le développement de la larve de Trichine.

Notons que des abcès et des escarres produits par des injections sous-cutanées d'émétique ou de 606 rendent difficile l'administration prolongée de ces produits.

#### CONCLUSIONS.

I. — La femelle de Trichine pénètre dans l'épaisseur de la paroi intestinale ; elle s'arrête ordinairement dans le chorion de la muqueuse et ne dépasse pas la *muscularis mucosæ*. Contrairement aux assertions de Cerfontaine, elle n'atteint pas les ganglions mésentériques.

La femelle pond ses larves, soit dans les vaisseaux lymphatiques, soit dans leur voisinage. Les larves suivent la voie lymphatique pour gagner le courant circulatoire. Il serait donc utile, dans le cas d'ingestion de viande suspecte, de pratiquer l'examen quotidien du sang. On pourrait ainsi dépister la trichinose dès le début de son évolution.

II. — Les cellules épithéliales des glandes de Lieberkühn montrent souvent de nombreuses figures de karyokinèse, aussi bien au voisinage immédiat des vaisseaux lymphatiques envahis par la Trichine qu'à une certaine distance de ceux-ci.

III. — Les larves peuvent gagner la cavité séreuse (péritoine, plevre, péricarde), mais elles y périssent très rapidement.

IV. — Il faut accepter comme définitivement démontrée la pénétration de la larve de Trichine dans l'épaisseur de la fibre musculaire primitive. Il est incontestable que la larve s'introduit dans la cellule musculaire, parce qu'elle y trouve, mieux



que partout ailleurs, les éléments nutritifs dont elle a besoin pour son développement.

V. — En traversant la muqueuse intestinale, la Trichine, toute souillée de microbes, les sème sur son passage.

Comme le montre l'étude bactériologique du sang de l'homme et des animaux infestés, le caractère dominant des infections dues à la Trichine est d'être polymicrobiennes.

Il est difficile de nier que la fièvre, les abcès et la septicémie mortelle qu'on observe quelquefois chez l'homme ne soient dus à des microbes inoculés par la Trichine.

VI. — Le sérum d'animaux (rats, cobayes) infestés par la Trichine acquiert des propriétés toxiques; ces dernières peuvent apparaître déjà neuf jours après l'ingestion de viande trichinée; elles peuvent se manifester jusqu'à un mois après l'infestation. Ces sérums sont toxiques aussi bien pour le cobaye que pour le rat: c'est-à-dire qu'ils sont en même temps iso et hétérotoxiques. La toxicité du sérum de cobaye infesté est en rapport avec l'intensité de l'infestation larvaire. La sensibilité des animaux à ces substances toxiques est inégale, sujette à des variations individuelles.

Les animaux qui survivent à l'injection de sérum toxique présentent au bout de quelques jours une maigreur extrême.

L'urine des animaux fortement infestés peut aussi devenir toxique.

VII. — La recherche d'anticorps spécifiques dans le sérum d'animaux trichinés n'a pas donné de résultats satisfaisants, ni par la méthode des précipitines, ni par celle de la fixation du complément. Dans ces expériences, on a employé comme antigène l'extrait aqueux de muscles farcis de larves.

VIII. — Les cas de réinfection spontanée observés par nous confirment les expériences de Rupprecht, d'Askanazy et autres qui ont montré l'impossibilité d'immuniser les animaux contre une nouvelle infestation.

IX. — Il n'existe pas de traitement préventif ou abortif de la trichinose. On peut quelquefois ralentir l'évolution de cette helminthiase par des injections d'émétique. Le 606 d'Ehrlich ne paraît exercer aucune action sur les larves de Trichine.

## EXPLICATION DE LA PLANCHE V

Ces dessins montrent la pénétration de la larve de Trichine dans l'épaisseur de la fibre musculaire primitive.

1. — La larve a pénétré à moitié dans la fibre primitive (*a*);
2. — (*a*) On voit la larve dans toute sa longueur au centre même d'une fibre primitive encore tout à fait intacte.
3. — (*a*) Larve de Trichine; (*b*) petite cavité résultant d'un défaut de substance musculaire.
4. — On a en *a*, *a'*, *a''* la coupe transversale de larve ayant pénétré dans l'épaisseur de la fibre primitive.
5. — *a*) Larve; *c*) substance musculaire en désagrégation au voisinage du myoplasme resté encore intact et gardant encore toute sa striation.
6. — On voit en *c* dans une fibre parasitée (*a*), et ayant perdu sa structure normale, un petit îlot de myoplasme gardant encore sa striation et muni de plusieurs noyaux.

## RECHERCHES SUR LES POISONS

### PRODUITS PAR L'ASPERGILLUS FUMIGATUS

par E. BODIN et C. LENORMAND,

Professeurs à l'École de médecine de Rennes.

L'un de nous a signalé dans les cultures d'*A. fumigatus* l'existence d'un poison qui a été, provisoirement et sous toutes réserves, désigné sous le nom de toxine (1). Les recherches publiées alors n'ont porté que sur le liquide de culture du champignon, aussi ce premier mémoire comprend-il seulement la description des symptômes que l'injection du liquide toxique détermine chez certains animaux, et quelques indications sur les conditions dans lesquelles la toxicité apparaît dans les cultures.

Depuis, nous avons continué l'étude de cette question qui nous est apparue de plus en plus complexe et ce sont les faits que nous avons observés que nous voulons résumer ici. Si incomplets qu'ils soient, ils nous ont paru intéressants à publier : au cours de ces dernières années, en effet, des travaux remarquables ont attiré l'attention sur les substances toxiques élaborées par les champignons pathogènes et sur les modifications que les mycoses peuvent déterminer dans les humeurs de l'organisme et qui sont très analogues à celles que l'on observe dans les maladies bactériennes.

Parmi ces travaux, citons ceux de Bruno Bloch et de R. Massini (2), après ceux de M. Truffi (3) sur les Trichophyton ; ceux de Roger (4) sur les modifications du sérum des animaux

(1) E. BODIN et L. GAUTIER, Note sur une toxine produite par l'*A. fumigatus*. Ces *Annales*, 1906, p. 209.

(2) BRUNO BLOCH et R. MASSINI, Etudes sur l'immunité et l'hypersensibilité dans les maladies provoquées par les hyphomycètes. *Zeitschrift für Hyg. und Infektionskrankheiten*, 1909. Pl. 13, fasc. 4, p. 68. — BRUNO BLOCH, Die Trichophytien. *Medizinische Klinik*. Berlin, 1908, n° 51.

(3) M. TRUFFI, Ricerche sulla trychophitina. *Clinica medica italiana*, 1904.

(4) ROGER, Modifications du sérum des animaux vaccinés contre l'*Oïdium albicans*. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 4 juillet 1896.



vaccinés contre l'*Ordium albicans*; ceux de Verliac (1) sur l'Actinomyces; les découvertes de Widal et Abrami (2), de Pautrier et Lutembacher (3), de Blanchetière et Gougerot (4), de de Beurmann sur les propriétés agglutinantes du sérum des malades atteints de mycoses.

Ajoutons que M. le professeur Roger (5) signalait récemment dans les extraits d'*A. fumigatus*, préparés par la trituration des cellules comme l'indique Concetti pour le muguet, la présence d'une substance toxique capable de déterminer la paralégie chez le lapin.

Tout dernièrement enfin, B. Santon (6) a montré que les spores d'*A. fumigatus* renferment une substance, soluble dans le chloroforme, qui les protège contre la phagocytose.

#### EXISTENCE DE DEUX POISONS DIFFÉRENTS DANS LES CULTURES d'*A. fumigatus*.

Nous dirons, d'abord, que nous avons trouvé dans les cultures d'*A. fumigatus* deux poisons distincts, l'un doué de propriétés tétanisantes et convulsivantes et l'autre possédant au contraire un pouvoir déprimant chez certains animaux. Ces substances sont bien les mêmes, à notre avis, que celles qui ont été signalées dans les cultures de ce champignon par Ceni (7)

(1) VERLIAC, Recherches expérimentales sur les toxines de l'Actinomyces. *Thèse de Paris*, 1907.

(2) WIDAL et ABRAMI, Séro-diagnostic de la sporotrichose par la séro-agglutination. La coagglutination mycosique, etc. *Soc. médic. des hôpit. de Paris*, 19 juin 1908. — WIDAL, ABRAMI, JOLTRAIN, BRISSAUD et WEIL, Séro-diagnostic mycosique. *Ces Annales*, 1910, n° 1.

(3) PAUTRIER et LUTEMBACHER, Premier cas de sporotrichose diagnostiqué par une subcutiréaction positive. *Soc. médic. des hôpit. de Paris*, 9 juillet 1909.

(4) BLANCHETIÈRE et GOUGEROT, Sur la composition chimique du Sporotrichum Beurmanni. Ses endotoxines. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 17 juillet 1909.

(5) ROGER, Les endotoxines microbiennes. *Comptes rendus de la Soc. de Biologie*, 17 juillet 1909.

(6) B. SAUTON, Germination *in vivo* des spores d'*A. niger* et d'*A. fumigatus*. *Ces Annales*, 1912, p. 48.

(7) CENI et BESTA, Ueber die Toxine von *Asp. fumig.* und *A. flavescens* und deren Beziehungen zur Pellagra. *Centralbl. f. allg. Path. u. pathol. Anatomie*, t. XIII, n° 23, déc. 1902, analysé in *Bull. de l'Inst. Pasteur*, t. I, p. 33. — CENI et BESTA, Die pathogen. Eigenschaften des *Asp. niger* mit Bezug auf die Genese der Pellagra, analysé in *Bull. de l'Inst. Pasteur*, t. III, p. 740.

C. CENI, Potere patogeno dell *Asp. ochraceus* e suo rapporto coll' etiologia e patogenesi della pellagra. *Riv. speriment. di freniatria*, vol. XXXI, fasc. 2, 1905. — C. CENI, Nuovi concetti sull' etiologia e cura della pellagra, *Giornale*

et Besta et par Paladino-Blandini (1). Voici l'expérience qui permet d'établir la coexistence des deux poisons dans une culture d'*A. fumigatus*.

Si l'on prend 250 cent. cubes de liquide de cultures d'*A. fumigatus* sur milieu de Raulin, après 5 à 6 semaines à l'étuve à 25 degrés, et si l'on traite ce liquide par l'éther que l'on évapore ensuite, on obtient un résidu gras, huileux, qui détermine chez le lapin et chez le cobaye, en injection sous-cutanée, des accidents tétaniques et convulsifs, débutant au bout de 30 à 40 minutes et qui entraînent la mort en quelques heures.

Or, si l'on reprend les 250 cent. cubes de liquide ainsi épuisés par l'éther et si on les distille, après action de la trompe pendant un temps suffisant pour enlever toute trace d'éther, de façon à obtenir rapidement 20 à 25 cent. cubes de distillat, on constate que ce produit, dont la réaction est fortement alcaline, est toxique pour le cobaye. Injecté sous la peau de cet animal, il cause des phénomènes de dépression et de paralysie qui commencent 20 à 30 minutes après l'injection et qui sont mortels en 1 à 2 heures.

Cette expérience permet de conclure à l'existence d'au moins deux substances toxiques : l'une, convulsivante, soluble dans l'éther ; l'autre, déprimante, insoluble ou peu soluble dans l'éther et qui passe à la distillation du liquide de culture.

*Poison déprimant.* — Pour le moment, nous ne pouvons dire que très peu de chose du poison déprimant, dont la présence ne nous a pas paru absolument constante dans toutes les cultures. D'après nos observations, il existe surtout dans les cultures sur le liquide de Raulin, vieilles de plusieurs semaines et quand le milieu est devenu bien alcalin.

Il faut distiller le liquide de culture alcalin pour extraire le poison, car la neutralisation préalable avec un acide quelconque empêche la ou les substances toxiques de passer à la distillation.

Le distillat est lui-même fortement alcalin et il dégage une odeur ammoniacale ; il agit comme un poison déprimant, même si on le neutralise exactement avec un acide comme l'acide tartrique ou l'acide chlorhydrique.

*della Reale Soc. Italiana d'Igiene*, 1905. — C. CENI. Di una nuova specie di *As. varians* e delle sue proprietà patogene in rapporto coll'etiologia della pellagra, *Riv. speriment. di freniatria*, vol. XXXI, fasc. 3-4, 1905. — C. CENI. Sulla reazione fenolica in rapporto coi tossici pellagrogeni, *Riv. pellagologica Italiana*, 1906.

(1) PALADINO-BLANDINI, Tossici di ifomiceti. *Arch. di farmacologia speriment. e Scienze a'fini*. Anno 5, vol. V, 1906.

Ce poison, qui résiste à l'ébullition, est actif sur le cobaye qu'il tue avec des phénomènes de paralysie et de dépression, sans déterminer d'accidents tétaniformes. 20 cent. cubes de distillat, obtenus avec 200 cent. cubes de liquide de culture de deux mois sur milieu de Raulin, tuent un cobaye adulte en une ou deux heures. Par contre, la même dose paraît inactive en injection sous-cutanée, ou en injection intraveineuse chez le lapin.

*Poison tétanisant. — Méthode d'extraction :* C'est celui que nous avons étudié partiellement dans notre premier travail, mais que nous n'avions pas réussi, à ce moment, à extraire facilement des cultures. Depuis, nous basant sur les travaux de Ceni et Besta, de Paladino-Blandini et aussi sur ceux de Auclair (1), nous avons utilisé une méthode qui nous a donné de bons résultats. Elle consiste à traiter par l'éther le liquide de culture, ou mieux les cultures elles-mêmes.

Procédant de la sorte, nous avons constaté que ce poison existe surtout dans la plante elle-même et qu'il ne passe dans le liquide qu'en petite quantité, parce qu'il est relativement peu soluble dans l'eau. Soluble dans l'alcool, l'éther, l'éther de pétrole, la benzine, le chloroforme, le sulfure de carbone, on peut aisément l'extraire à l'aide de ces solvants, parmi lesquels l'éther est celui qui nous a paru le meilleur et le plus commode.

Pour la préparation du poison, nous utilisons le champignon préalablement lavé à l'eau distillée, puis que l'on broie et que l'on met à macérer pendant 48 heures dans un mélange à parties égales d'alcool à 90 degrés et d'éther. Le liquide séparé par filtration est ensuite distillé dans le vide à 45 degrés jusqu'à ce qu'il ne reste plus qu'un résidu aqueux trouble. On reprend ce résidu que l'on agite pendant quelques minutes dans une ampoule à robinet avec une ou deux fois son volume d'éther. On sépare l'éther que l'on évapore au bain-marie et l'on obtient un résidu huileux, jaunâtre, de consistance grasse, dégageant une odeur spéciale, rappelant celle de certaines plantes fraîches broyées, et dont la toxicité est très grande pour les animaux sensibles chez lesquels il détermine des accidents convulsifs et tétaniformes, comme il a été indiqué dans notre premier travail auquel nous renvoyons pour la description de ces symptômes.

*Propriétés du poison.* — Jusqu'ici, nous n'avons pu isoler le poison, de sorte que nous ne savons pas exactement de quelle

(1) AUCLAIR, Recherches sur les poisons microbiens. *Arch. de méd. expérim.*, 1903, p. 725.



substance chimique il s'agit, ni même s'il n'y a pas plusieurs poisons. Nous avons pu cependant déterminer quelques-unes de ses propriétés en expérimentant avec la matière huileuse extraite des cultures, comme il a été dit précédemment, et qui renferme le ou les corps toxiques (1).

En ce qui concerne les symptômes que détermine, chez les animaux sensibles, le poison convulsivant, nous avons fait de très nombreuses expériences; elles ont toutes confirmé ce que nous avions dit à ce sujet dans notre premier travail. Nous indiquerons donc seulement quelques points particuliers et nouveaux que nous ont appris les nouvelles recherches faites avec une meilleure méthode d'obtention du poison.

En premier lieu, nous avons pu mettre en évidence la très grande toxicité de ce poison pour les espèces sensibles comme le lapin. Chez cet animal, il suffit, par la voie intraveineuse, de 1/10 de milligramme par kilogramme, de l'extrait huileux, obtenu comme il a été dit dans la note précédente, pour déterminer des accidents graves. Avec 1/2 milligramme par kilogramme, la mort survient presque fatalement. Or, il est évident que le poison ne représente qu'une partie de l'extrait injecté.

Comme, dans nos premières expériences, nous avons vu que la sensibilité du cobaye est moins grande que celle du lapin. Il faut ordinairement une dose triple (par kilogramme) de la dose mortelle pour ce dernier pour entraîner la mort du cobaye.

Ensuite, nous avons tenu à vérifier la résistance du pigeon à ce poison, résistance que nous avons déjà signalée et qui nous a semblé d'autant plus étonnante que l'on connaît la sensibi-

(1) Afin de purifier autant que possible le poison, nous avons utilisé sa solubilité partielle dans l'eau de la façon suivante : l'extrait éthéré de culture est agité fortement avec de l'eau distillée et il se fait une sorte d'émulsion. On filtre alors à la bougie Berkefeld pour obtenir un liquide limpide un peu opalescent. Ce liquide est repris par l'éther qui, évaporé, abandonne une huile jaunâtre ayant les caractères du poison. On reprend le résidu qui s'est déposé sur la bougie, on l'agite avec de l'eau distillée et on recommence l'opération indiquée ci-dessus. En faisant plusieurs fois de suite cette opération, on arrive à extraire la plus grande partie, mais non la totalité du poison. Si imparfaite qu'elle soit, c'est cette méthode qui nous a donné jusqu'ici les résultats les meilleurs, permettant d'obtenir la substance toxique débarrassée d'une partie des corps gras que l'éther enlève avec elle aux cultures du champignon.

lité de cet animal aux inoculations d'*A. fumigatus*. Divers essais nous ont donné des résultats identiques à ceux que nous avons obtenus en 1906 ; ils ont mis en relief la très grande résistance du pigeon au poison tétanisant, mais ils nous ont montré que cette résistance n'est cependant pas absolue. En employant de très fortes doses, on peut déterminer des accidents convulsifs et tétaniformes chez le pigeon, comme chez le lapin et chez le cobaye. Voici deux de nos expériences à cet égard.

Un pigeon ayant reçu la dose 200 fois mortelle pour le même poids de lapin, a présenté des accidents convulsifs et tétaniformes pendant 3 heures : il s'est rétabli le lendemain de l'injection. Dans une autre expérience, un pigeon de 330 grammes a reçu 560 fois la dose mortelle pour le même poids de lapin, il a eu des accidents tétaniques violents pendant 5 heures environ, mais 48 heures après il paraissait complètement rétabli.

Enfin, nous avons vu que le poison tétanisant est actif, chez le lapin au moins, quand on l'introduit par la voie digestive. En injectant le poison dans l'estomac à l'aide d'une sonde, nous avons déterminé des accidents tétaniques classiques entraînant la mort, mais il fallut employer une dose beaucoup plus considérable que dans les injections sous-cutanées ou intra-veineuses.

#### ACTION DE LA TEMPÉRATURE.

Dans notre premier travail, nous avons noté que le poison tétanisant de l'*A. fumigatus*, chauffé pendant plus de trente minutes au-dessus de 85 degrés, est certainement atténué, mais qu'il faut atteindre 120 degrés pendant trente minutes dans la vapeur d'eau pour que le poison, à la dose plusieurs fois mortelle, ne détermine plus d'accidents tétaniques chez le lapin ; remarquons toutefois qu'après avoir subi l'action de la température dans ces conditions, le poison cause encore chez les animaux sensibles certains phénomènes tels que anxiété, hyperexcitabilité, montrant que la substance toxique n'est pas complètement détruite.

Les nouvelles expériences que nous avons faites confirment ces conclusions. Par exemple, nous avons injecté au lapin, par voie sous-cutanée, 48 fois la dose mortelle de poison chauffé à l'autoclave à 120 degrés pendant quarante-cinq minutes ; l'animal a très bien résisté, mais il a offert de l'anxiété au cours des deux heures qui ont suivi l'injection.

En outre, nous avons constaté que les conditions dans lesquelles le chauffage est opéré ont ici une importance de premier ordre. Le chauffage en présence de l'eau amène certainement une altération du poison plus ou moins rapide, suivant le degré de température et selon le temps de chauffe, tandis que le chauffage à sec semble sans action. Ainsi, en chauffant à 120 degrés pendant quarante-cinq minutes du poison bien sec dans un tube scellé, nous avons vu que les propriétés toxiques sont conservées. On peut en conclure que l'eau, à une température élevée et pendant un temps suffisant, exerce une action sur la molécule chimique du poison et qu'elle doit amener dans cette molécule des modifications qui atténuent les propriétés tétanisantes et convulsivantes. De l'indication fournie par ces faits, il nous paraît intéressant de rapprocher celle que donnent les expériences relatives à l'action des alcalis.

*Action des alcalis et des acides.* — En opérant avec la soude, nous avons vu, dans une série d'essais, que la toxicité du poison diminue et finit même par disparaître. Seulement les conditions de cette action (temps, température, degré de concentration, etc...) jouent un rôle très important qu'il nous est difficile de préciser pour le moment; voici deux expériences qui permettent de se rendre compte de cette action de la soude.

Un résidu aqueux contenant 4 fois la dose mortelle pour un cobaye a subi l'action de la soude à 2 1/2 p. 100 pendant cinquante-deux heures à 40 degrés : après ce temps, il s'est montré dépourvu de toxicité.

Un autre résidu aqueux contenant aussi 4 fois la dose mortelle pour le lapin, reste encore actif après action de la soude à 1 p. 100 à 37 degrés pendant quarante heures, mais sa toxicité est atténuée, car il ne détermine pas la mort.

Les acides nous ont paru beaucoup moins actifs que la soude; ainsi, en employant l'acide chlorhydrique, nous avons constaté qu'au taux de 2 1/2 p. 100 et après quatre jours à la température du laboratoire, les solutions aqueuses toxiques ont conservé leur pouvoir nocif vis-à-vis des animaux. Dans ce cas, il se produit une clarification du liquide sous l'influence de l'acide, avec formation d'un dépôt au fond du vase. C'est dans ce dépôt que l'on retrouve la plus grande partie du poison.

*Dialyse.* — Ajoutons enfin que le poison tétanisant passe à travers la membrane du dialyseur. Avec le liquide de culture ou avec une émulsion aqueuse, obtenue à l'aide de l'extrait éthéré de la plante elle-même, et après quarante-huit heures de dialyse à la température du laboratoire, nous avons trouvé le poison dans le liquide dialysé. Nous ferons remarquer que cette méthode pourrait être utilisée pour séparer, au moins partiellement, la substance toxique des extraits de culture.

CONDITIONS D'APPARITION DU POISON  
DANS LES CULTURES D'*ASPERGILLUS FUMIGATUS*.

Munis d'une meilleure méthode d'extraction du poison, nous avons pu déterminer son existence avec beaucoup plus de précision que nous ne l'avions fait dans nos premières recherches, et nous avons vu que la formation de ce poison a lieu, dans toutes les cultures sur les divers milieux, dans des conditions beaucoup plus larges que nous ne le pensions tout d'abord.

Ainsi, les cultures sur solutions simplement peptonées à 1 p. 100 dont le développement reste médiocre, contiennent le poison : nous l'avons vérifié au bout de un mois de séjour de ces cultures à l'étuve à 25 degrés. Cependant il est certain que la production de la substance toxique est plus grande dans les cultures qui se développent abondamment sur les milieux favorables, comme sur le bouillon peptonisé à 1 p. 100 et glucosé à 3 p. 100. Sur ce milieu, nous avons décelé le poison dans la plante et dans le liquide de culture dès le quatrième jour, à l'étuve à 25 degrés. Après un mois, ces cultures sont très riches en poison.

Ceci est parfaitement conforme aux conclusions de Céri et Besta sur le même sujet, mais sur un autre point nous sommes en désaccord avec ces savants. En effet, dans leurs travaux, ils insistent sur la variation de production des poisons tétanisants de l'*Aspergillus fumigatus* (et d'autres champignons aussi), suivant les diverses saisons de l'année. D'après eux, ces plantes présentent leur maximum de sécrétions toxiques au printemps et en été ; durant l'hiver, ce pouvoir diminue considérablement ou même disparaît tout à fait. Ce phénomène ne serait pas seulement en rapport avec les variations saisonnières de tem-



pérature, mais aussi avec d'autres conditions, car les auteurs sus-indiqués ont vu le pouvoir toxique disparaître pendant l'hiver dans des cultures d'*Aspergillus* maintenues à l'étuve à 37 degrés.

Or, après une étude de cinq années, au cours desquelles nous avons recherché un grand nombre de fois le poison tétanisant dans les cultures d'*Aspergillus fumigatus* développées dans notre laboratoire à l'étuve à 25 degrés, nous avons d'une manière constante trouvé ce poison quelle que soit l'époque de l'année et sans que nous puissions observer à cet égard de différences appréciables entre les cultures faites dans les mêmes conditions aux différents mois de l'année.

#### NATURE DU POISON TÉTANISANT.

Actuellement, il nous est impossible de préciser la nature chimique du poison tétanisant et convulsivant de l'*Aspergillus fumigatus*, et cette question nous paraît très difficile à résoudre. Cèni et Besta pas plus que Paladino-Blandini, qui ont étudié ce poison, ne se prononcent à ce sujet : les premiers affirment seulement qu'il n'offre aucun rapport avec les composés phénoliques.

Les recherches que nous avons faites depuis 1906 nous autorisent cependant à dire que, contrairement à l'hypothèse émise lors de notre premier travail, le poison tétanisant et convulsivant de l'*Aspergillus fumigatus* n'appartient pas au groupe des toxines, si l'on prend ce terme dans son acception usuelle. Sa faible solubilité dans l'eau, sa solubilité très grande dans l'alcool, l'éther, le sulfure de carbone, le chloroforme, la benzine, sa résistance à la chaleur sont à cet égard des arguments très importants.

Nous ajouterons aussi que nous avons cherché en vain, avec nos extraits toxiques, les réactions classiques des alcaloïdes. Il paraît donc acquis que nous n'avons affaire, en l'espèce, ni à une substance d'ordre diastasique ni à un corps de nature alcaloïdique. C'est tout ce que, pour le moment, nous pouvons dire d'une façon précise.

S'il nous est permis toutefois de faire ici une hypothèse, sous toutes réserves, nous dirons qu'il est possible que ce corps,

doué de pouvoir tétanisant et convulsivant, appartienne au groupe chimique des substances grasses et particulièrement de celles que l'on étudie depuis un certain temps sous le nom de lipoïdes. Nous nous appuyons pour cela sur l'action des solvants tels que l'éther, l'alcool, le sulfure de carbone, le chloroforme, la benzine, sur la faible solubilité du poison dans l'eau, sur sa résistance à la chaleur, toutes propriétés qui se retrouvent chez les lipoïdes, parmi lesquels des travaux modernes, notamment ceux de Korschun, de Morgenroth, de Landsteiner, de Levaditi, d'Iscovesco, de Noguchi, de Lefman, de Bloch, de Bang, ont fait connaître diverses substances toxiques élaborées par les cellules vivantes.

# **DE LA VÉSICULE BILIAIRE ENVISAGÉE COMME LIEU D'INOCULATION**

## **CONTRIBUTION A L'ÉTUDE DE L'IMMUNITÉ ET A LA PHYSIOLOGIE GÉNÉRALE**

par HENRI VIOLE  
de la marine de guerre.

### **INTRODUCTION**

De tous les modes d'inoculation vaccinale, le meilleur à employer serait assurément celui qui, tout en provoquant chez l'animal opéré le moins de réaction possible, l'immuniserait rapidement et intensivement. Il est évident que des bactéries ou des toxines ne peuvent être injectées dans l'organisme par doses massives intermittentes, ce qui produit chez l'animal des ressauts de réaction violente, mais plutôt d'une façon lente et continue, afin que le sujet, recevant à chaque instant le virus ou la toxine, soit totalement et doucement imprégné par lui. Il peut alors réagir sans grand fracas et faire inconsciemment, pour ainsi dire, son immunisation. La méthode des inoculations successives, par doses croissantes de virus, dont le degré de toxicité augmente parallèlement, répond à ce but. C'est elle, en effet, qui dans la pratique des vaccinations fournit les meilleurs résultats.

Mais, là encore, l'immunisation ne peut se faire que par petits à-coups, par oscillations successives, dont on ne saurait prévoir la grandeur; la période d'immunisation est en outre fort longue, se chiffrant par plusieurs mois (4, 5, 6 et plus); et les phénomènes intimes qui président à l'élaboration des anticorps sont difficiles à surprendre.

Un antigène virulent, placé dans l'organisme en une position telle qu'il pourrait difficilement se généraliser, mais facilement être atteint par les leucocytes bactériophages, provoquerait la formation abondante d'anticorps spécifiques. Mais est-il possible de résoudre ce problème? Autrement dit, peut-on trouver dans

l'organisme un point tel que les bactéries virulentes situées en ce lieu et ne le pouvant quitter, sauf dans des cas très rares, restent soumises à l'action des leucocytes, dont le but est de détruire ces corps bactériens et de produire des anticorps?

Le sac de collodion, chargé de bactéries et déposé dans la cavité péritonéale d'un animal, afin d'obtenir par des passages successifs un renforcement de virulence (Roux, Metchnikoff et Salimbeni), ne paraît pas directement applicable.

En effet, si l'on introduit dans la cavité péritonéale d'un lapin un sac de collodion renfermant 1 centimètre cube de culture typhique de 24 heures en bouillon, et que l'on procède tous les 3 jours à des essais de mensuration du taux agglutinatif du sérum de l'animal, on ne constate qu'un renforcement très faible des propriétés agglutinantes de ce sérum.

Deux lapins, l'un ayant depuis 1 mois un sac de collodion,ensemencé avec une culture typhique, et l'autre servant de témoin, sont inoculés intrapéritonéalement avec une culture typhique à dose mortelle (environ 10 centimètres cubes). Les deux animaux meurent, à peu près dans le même laps de temps; il n'y a pas eu d'immunisation forte chez le premier sujet dont la mort survient quelques heures après celle du témoin. Il paraît s'ensuivre que des corps bactériens inclus dans des cavités closes et imperméables ne permettent point l'élaboration d'anticorps spécifiques. Toutefois, la question est plus complexe, ce qui explique quelques résultats différents.

C'est ainsi qu'avec des microbes extrêmement virulents pour une espèce animale, la méthode des sacs de collodion chargés de ces cultures a procuré quelques propriétés vaccinales aux animaux en expérience. Il en est ainsi avec le choléra des poules, où Bisanti trouvait qu'après 20 jours les sujets résistaient à l'ingestion d'une culture virulente. Dans ce cas, les anticorps formés sont antitoxiques, puisque la mince paroi de collodion s'oppose au passage des corps organisés (microbes ou phagocytes) mais laissent diffuser dans l'organisme les toxines microbiennes, ou plus exactement certaines toxines (Rodet et Gueheff). Il en résulte que si l'on a affaire à une toxine dialysable très active, comme celle pouvant être produite par le bacille tétanique, les leucocytes, ne pouvant atteindre les spores protégées par la membrane de collodion ou mieux par



une membrane de papier, plus perméable à la toxine (Vaillard, Vincent et Rouget), l'animal succombera au tétanos. En effet, les spores, se développant, donneront des bacilles qui sécréteront la toxine mortelle.

Le procédé du sac de collodion serait donc utilisable s'il pouvait être également perméable aux leucocytes et imperméable aux bactéries. Ces conditions, en apparence contradictoires, nous les trouvons dans la vésicule biliaire de certains animaux et en particulier du lapin.

### VÉSICULE BILIAIRE

#### TECHNIQUE DE L'INOCULATION INTRAVÉSICULAIRE

##### I. — VÉSICULE BILIAIRE.

La vésicule biliaire chez le lapin se présente sous la forme d'un sac ovoïde ayant en moyenne 2 centimètres de longueur suivant son grand axe et 1 centimètre de largeur. Sa capacité est d'environ 1 centimètre cube, mais très irrégulière, puisque, avec des animaux de poids égaux, ce nombre peut varier du simple au triple.

Sa paroi est constituée par deux tuniques, l'une externe se subdivisant en deux zones : périphérique, fibreuse; centrale, musculaire. Cette couche comprend des fibres longitudinales externes, circulaires internes; l'autre interne, muqueuse, comprenant un chorion constitué par un tissu conjonctif réticulé. Des amas leucocytaires, véritables follicules clos, sont répandus dans ce chorion qui se soulève en plis saillants, nombreux et très irrigués. Au-dessus, outre le derme et l'épithélium, on constate la présence d'une membrane basale. L'épithélium est simple, prismatique, à noyau ovoïde et revêtu d'un plateau strié.

Mais quels sont les rapports de cette vésicule avec le foie, avec la circulation locale et générale? Est-elle, abstraction faite de la région canaliculaire qui s'anastomose avec le canal hépatique, absolument indépendante?

Elle présente des connexions avec les tissus hépatiques, et elle est reliée par des vaisseaux au reste de l'organisme.

Ses faces latérales externe et interne, sa face inférieure et son pôle, revêtus par le seul feuillet viscéral du péritoine, sont

libres de toute adhérence et permettent, en n'importe quel point, d'atteindre la vésicule. Mais sa face supérieure est intimement reliée au tissu hépatique; ni la déplétion, ni la réplétion de la vésicule ne permettent de la libérer de ses adhérences. La tunique fibro-musculaire adhère là au parenchyme par l'intermédiaire d'un tissu cellulaire assez épais. Les connexions vont plus loin : elles sont non seulement tissulaires, mais encore

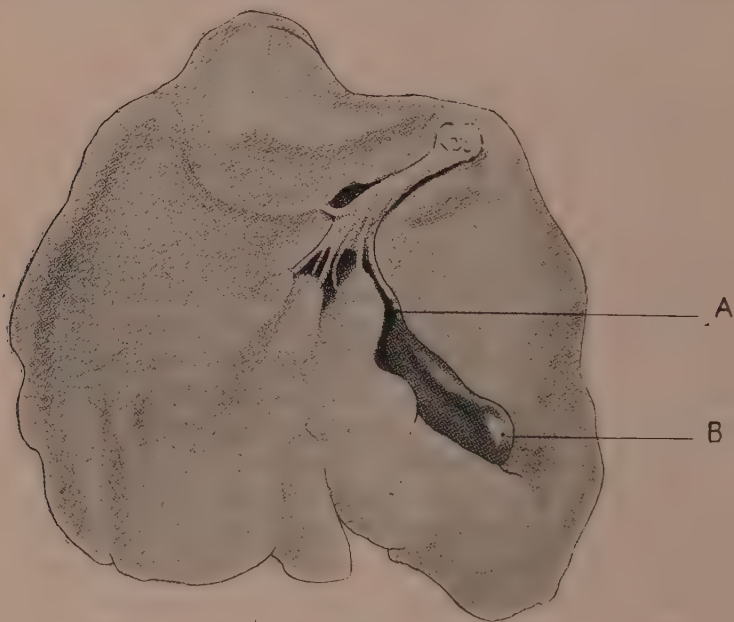


FIG. 1. — *Foie normal de lapin.*

A, Point où la vésicule biliaire est liée. — B, Point où la vésicule biliaire est ponctionnée.

vasculaires; et, dans cette région vésiculaire adhérente, on trouve les artères perforantes qui vont directement du foie à sa face supérieure, et des veines cystiques profondes qui pénètrent dans la fossette cystique et se ramifient à la manière des artères, formant un système de veines portes accessoires. Il en résulte que les communications entre le foie et la vésicule biliaire restent bien établies, alors même qu'une ligature est posée au col et comprend le canal cystique, l'artère cystique et les veines cystiques superficielles. Ces communications

hépato-vésiculaires sont mises en évidence par les inoculations de substances toxiques et par celles de corps microbiens.

I. *Injection de substances toxiques.* — Etant donnés deux lapins de même poids, on inocule à l'un, dans la veine marginale de l'oreille, 10 milligrammes de sulfate de strychnine, dis-

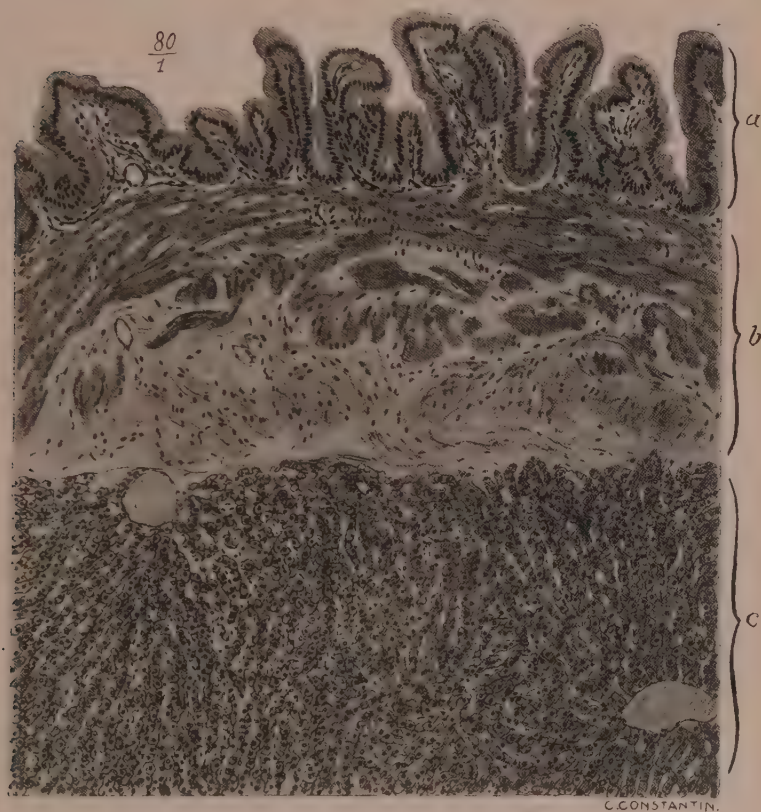


FIG. 2. — *Vésicule biliaire normale (face supérieure).*

*a*, Muqueuse : endothélium, chorion. — *b*, Couche musculo-fibreuse.  
*c*, Tissu hépatique.

sous dans 1 cent. cube d'eau stérilisée. La mort est immédiate par convulsions et tétanisation généralisées, se produisant avant même que l'aiguille soit retirée.

Si l'on fait une injection semblable au second lapin, mais en inoculant la solution dans la vésicule biliaire liée, on obtient

des résultats qui, quoique se rapprochant beaucoup des précédents, en diffèrent toutefois par la longueur d'évolution. Là encore, l'animal meurt, mais les phénomènes morbides n'apparaissent pas avec l'instantanéité précédente : pendant les 10 premières minutes, aucun symptôme ne se manifeste; puis, ce laps de temps écoulé, quelques convulsions apparaissent, donnant le signal du drame qui se déroule en quelques minutes.

II. *Inoculation de microbes.* — On prend deux lapins : l'un reçoit en injection intraveineuse 1 centimètre cube d'une culture charbonneuse en bouillon à 37 degrés, âgée de 8 jours; l'animal meurt en 24 à 36 heures généralement, avec les lésions caractéristiques du charbon. L'autre animal reçoit la même solution en même quantité dans la vésicule biliaire liée; il meurt également, mais avec un léger retard, après 48 à 52 heures.

Il résulte de ces faits que la paroi vésiculaire laisse passer ces différents corps en solution aqueuse, en bouillon, en eau peptonée, etc...

On voit, en outre, que les antigènes ne subissent pas de transformation appréciable dans leur passage à travers le foie, quoique ce dernier ait un rôle protecteur et éliminateur contre les toxines exogènes (1) et endogènes (2).

Les propriétés que nous venons de signaler ne sont pas particulières à la vésicule du lapin. Chez le cobaye, le mouton et le bœuf, la vésicule présente également des adhérences.

Chez le cobaye, la vésicule biliaire, relativement très grosse, présente une paroi mince et translucide, à travers laquelle apparaît la bile, jaune clair et très limpide. La face supérieure vésiculaire est entièrement et intimement adhérente au foie, sans présenter de plan de clivage, de telle sorte que toute séparation des deux organes entraîne un déchirement du tissu hépatique. Les vaisseaux allant de l'un à l'autre de ces organes sont situés dans la zone d'adhérence.

Chez le mouton, la vésicule, de dimensions très variables, parfois même totalement atrophiée, ayant d'ordinaire le

(1) HEGER (1873), ROGER (1887).

(2) DASTRE, *Dictionnaire de Physiologie*. Article « Foie ».



volume d'une figue, présente aussi avec le tissu hépatique des adhérences, comprenant dans leur intérieur de nombreux vaisseaux établissant la circulation entre les deux organes. Ces adhérences sont situées à la face supérieure, laissant libre le pôle vésiculaire et comprenant seulement la portion moyenne et canaliculaire de la vésicule.

Chez le bœuf, la vésicule est de forte dimension, ovoïde, ayant de 15 à 20 centimètres de long suivant son grand axe, à parois épaisses, vascularisées; le contenu est d'environ 150 à 200 grammes de bile; la face supérieure présente également de fortes adhérences avec le foie et de nombreuses vascularisations.

Chez le cheval, on sait que la vésicule biliaire fait défaut.

## II. — TECHNIQUE DE L'INOCULATION INTRA-VÉSICULAIRE.

La méthode que nous avons employée pour faire les inoculations dans la vésicule biliaire du lapin est la suivante :

Dans les premiers essais que nous fîmes, nous atteignons la vésicule en faisant l'incision suivant le rebord des fausses côtes droites. Le dégagement du foie était plus aisé et la mise à nu de la poche vésiculaire rendue ainsi très facile; mais l'opération était un peu longue par suite de la section des plans musculaires et de la ligature souvent obligatoire de l'artère mammaire droite.

C'est pourquoi, dans toutes les opérations suivantes, nous opérâmes suivant la ligne blanche en procédant aux différents temps que voici :

L'animal étant attaché par les membres sur un plateau de zinc, la région à opérer est épilée, puis aseptisée à l'alcool et à la teinture d'iode. On fait l'anesthésie à l'éther, si l'animal est trop sensible, car les mouvements brusques à certains temps délicats (injection dans la vésicule) peuvent compromettre le résultat de l'opération. Les téguments sectionnés suivant la ligne médiane, on tombe sur la ligne blanche, que l'on incise sur une longueur de 4 à 6 centimètres. On déchire le léger voile constitué par le péritoine, et le foie apparaît. On attire l'organe en bas, et on l'éverse de bas en haut et d'arrière en avant : le foie luxé, la face inférieure est ainsi mise à jour. En inter-

posant, d'une part, des tampons de gaze entre la coupole diaphragmatique et le foie ; en bourrant, d'autre part, l'espace intermédiaire entre la région inférieure du foie et les intestins, on « cale » la masse hépatique ; et les manœuvres de la vésicule, très en évidence, sont aisées. On passe sous le col ainsi dégagé, un fil de soie monté sur une aiguille de Reverdin, et on lie le canal en ce point. A l'aide d'une seringue de Pravaz ponction-

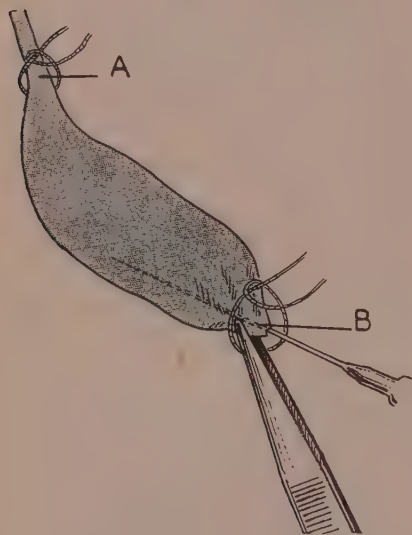


FIG. 3. — Schéma indiquant le mode d'inoculation intra-vésiculaire.

A, Point où la vésicule est d'abord liée. — B, Point où la vésicule est ensuite ponctionnée ; la bile est retirée par aspiration et remplacée par un antigène, puis la vésicule est liée en ce point.

nant la vésicule à son pôle libre, on aspire le contenu vésiculaire qui, dans beaucoup de cas, est riche en mucine, en sels concrétés, et forme ainsi un liquide épais, qui difficilement pénètre dans l'aiguille. En le diluant et en lavant la vésicule à plusieurs reprises avec de l'eau physiologique jusqu'à ce qu'elle sorte complètement incolore, on a un réservoir d'une capacité de  $\frac{1}{2}$  à 1 centimètre cube  $\frac{1}{2}$ , prêt à recevoir les inoculations de liquide pathogène. L'aiguille étant toujours en place (car il serait, dans le cas où on l'aurait retirée, très diffi-

cile de retrouver le premier orifice) et la seringue étant chargée du liquide antigénique, on pousse l'injection doucement jusqu'à ce que la vésicule ait atteint son volume primitif. A ce moment, toujours sans retirer l'aiguille, on passe un fil de soie comprenant dans sa boucle cette aiguille et la paroi vésiculaire, légèrement soulevée et tendue par une pince. Tout en dégageant l'aiguille, on serre le fil de façon que celle-ci, complètement retirée, aucune goutte de liquide ne vienne à sortir. Enfin, pour plus de sûreté, on met une pointe de feu sur l'orifice. On

enlève les tampons, on suture la ligne blanche à l'aide de trois ou quatre points de catgut. Les téguments sont réunis par quelques agrafes de Michel. En dernier lieu, on badigeonne à la teinture d'iode la plaie suturée, que l'on recouvre d'un peu de collodion.

#### OBTENTION D'ANTICORPS

##### PAR INOCULATION DANS LA VÉSICULE BILIAIRE

A la suite d'inoculations intravésiculaires de divers antigènes, l'organisme réagit par la formation d'anticorps spécifiques correspondants.

1. — Mais il est de toute nécessité de transformer la vésicule en un sac clos, ce qui s'obtient par la ligature du col. Autrement l'antigène inoculé dans la vésicule biliaire préalablement vidée de son contenu, mais libre, s'éliminera rapidement par voie intestinale sans provoquer la formation d'anticorps.

*Exemple* : Lapin n° 26 reçoit le 20 juillet dans la vésicule libre, sans contenu biliaire et lavée préalablement à l'eau légèrement alcalinisée, 1/2 tube de culture cholérique à 37 degrés sur gélose de 24 heures diluée dans 1 centimètre cube 1/2 d'eau physiologique. La température, 24 heures après, s'élève très légèrement (1° à 1° 1/2) durant 24 heures pour revenir ensuite à la normale. Le taux agglutinatif du sérum qui, avant l'opération, était de 1 pour 5, se maintient à ce chiffre 8, 10 et 15 jours après l'opération.

A ce moment, l'animal est sacrifié; la vésicule biliaire est sans adhérence, sans épaissement des parois, mais présente une très légère congestion de la muqueuse; son contenu est vert clair, constitué par de la bile, qui a rempli à nouveau la poche vésiculaire. Microscopiquement, ce liquide contient une proportion très élevée de cellules endothéliales; on ne voit ni leucocytes, ni bactéries. Toutefois, l'ensemencement en eau peptonée est positif et montre la présence de vibrions.

En un mot, l'inoculation de vibrions cholériques dans la vésicule biliaire libre a provoqué une légère réaction de la muqueuse; les vibrions cholériques ont disparu en grande partie après 10 à 15 jours et n'ont pas engendré la formation d'anticorps spécifiques.

Les ensemencements en eau peptonée de sang prélevé par

ponction intracardiaque pendant les 15 jours suivant l'inoculation, sont restés négatifs.

II. — Au contraire, l'antigène inoculé dans la vésicule transformée en cavité close donnera naissance à des anticorps.

Prenons le cas des vibrions cholériques inoculés dans une vésicule liée : après quelque temps, 10 à 15 jours, le sérum jouit de propriétés immunisantes.

III. — Si l'on vient à inoculer dans la vésicule liée une culture microbienne, mais cette fois préalablement tuée par la chaleur, l'animal ne paraîtra point réagir, et cette inoculation passera inaperçue. Toutefois, le sérum contient des anticorps, comme dans le cas précédent, quoiqu'en plus faible proportion.

A l'autopsie, faite 2 à 3 semaines après l'inoculation, on rencontre toujours une vésicule hypertrophiée, à contenu caractéristique. Au contraire, la vésicule est-elle liée après aspiration de son contenu et laissée vide, elle ne tarde pas à s'atrophier, et, au bout de quelques semaines, elle présente l'aspect d'une membrane desséchée et ridée.

Par quel mécanisme peut-on expliquer la production des divers anticorps?

Anatomiquement, nous constatons toujours, à la suite de nos opérations sur la vésicule liée, la même série de lésions, quel que soit l'antigène inoculé (virulent ou non : bactéries, toxines, hématies ou substances albuminoïdes); la vésicule biliaire a changé de volume, elle s'est hypertrophiée jusqu'à atteindre dans certains cas le volume d'un œuf de poule (voir les observations relatives à l'inoculation du bacille typhique).

La paroi est épaissie, indurée. Histologiquement, on constate en parcourant la coupe de dedans en dehors (voir figures aux chapitres « Choléra » et « Tuberculose ») :

1° *Que la tunique interne ou muqueuse présente :*

α) Un épithélium intact, à cellules peu desquamées, ni atrophiée ni hypertrophiées. Mais, entre ces cellules, on rencontre un très grand nombre de globules blancs (polynucléaires) se glissant soit vers la tunique externe, où ils transportent avec eux les anticorps élaborés, soit dans l'intérieur de la vésicule à l'effet de détruire l'antigène inoculé;

β) Un chorion très fortement épaissi et dont l'architecture



est modifiée par la triple présence de globules blancs (polynucléaires et mononucléaires) en abondance, de fibres conjonctives, de vaisseaux de néo-formation consistant en capillaires nombreux;

2° Que la tunique externe présente également une abondance anormale de leucocytes et de capillaires, mais laissant subsister intacte l'architecture primitive.

A l'intérieur de la poche, on trouve une substance semi-liquide essentiellement constituée par des globules blancs (polynucléaires).

Si nous prenons le vibron cholérique, par exemple, nous voyons qu'à son début, dans les premières heures qui suivent l'opération, il est en extrême abondance; injecté en petite quantité, il a pu dans ce milieu favorable se développer; sous son action, la muqueuse vésiculaire est rouge, congestionnée, desquamée, laissant tomber dans le liquide une quantité énorme de cellules endothéliales. Puis, les leucocytes commencent déjà à apparaître; très mobiles, attirés par un chimio-tactisme positif (toute toxine, tout corps microbien en faible proportion jouit de cette propriété), ils sont venus des différents points de l'organisme. Ils ont passé par les capillaires qui forment un réseau à la face supérieure de la vésicule, intimement reliée, nous le savons, à la face inférieure du foie. Grâce aux anastomoses vasculaires, et malgré la ligature du col qui intéresse le canal cystique et la plus grande partie des voies sanguines irriguant la vésicule, les leucocytes ont pénétré à travers les diverses tuniques vésiculaires et sont tombés dans la cavité même, se trouvant ainsi en présence des corps microbiens. Là, sous l'influence des toxines sécrétées, une partie des leucocytes a été détruite; mais l'afflux continuant à se produire, les globules blancs, à leur tour, toujours renouvelés, ont pu vaincre la résistance microbienne, et, par leur action diastatique propre, immobiliser, puis englober et finalement détruire les vibrions. Aux dépens de ces corps microbiens disparus, se sont élaborées, dans le cytoplasme leucocytaire, des substances actives qui, lors d'une nouvelle injection cholérique, viendront sensibiliser les nouveaux vibrions dont la destruction sera parachevée par les alexines banales du sérum. C'est là, schématiquement résumée, dans le cas actuel, la théorie de

Metchnikoff sur l'immunité, théorie phagocytaire grâce à laquelle les phénomènes qui se passent dans la vésicule s'expliquent aisément, et sans laquelle, par contre, il est impossible, avec les seules théories humorales, d'interpréter les faits. Le leucocyte joue dans ces phénomènes d'élaboration des anticorps le rôle prépondérant : sans leucocytes, point de vaccination possible, point d'anticorps pouvant se former. Les expériences citées plus haut le prouvent avec évidence. Vient-on à favoriser l'afflux leucocytaire dans la vésicule, des anticorps se forment en plus ou moins grande abondance ; vient-on au contraire à entraver cette leucocytose, à interdire aux globules blancs l'entrée de cette poche vésiculaire, on ne perçoit pas la plus faible réaction d'immunité.

A la suite de la résorption des corps étrangers, les leucocytes se mettent à élaborer une grande quantité de sensibilisatrices ou phylocytases, et l'on admet que la rate, la moelle osseuse, les ganglions, sont les foyers producteurs de ces substances. Élaborées en certains points seulement, elles resteraient localisées dans ces mêmes globules blancs qui les ont engendrées ; ou bien, éliminées par ces leucocytes encore vivants, elles se disperseraient dans le plasma, se généraliseraient dans tout l'organisme. Et, de fait, ces deux hypothèses se justifient par les constatations suivantes :

1° Dans le sérum on trouve, après quelques jours, des anticorps parfois en quantité notable, capables, à faible dose, de neutraliser des toxines très actives : les agglutinines, les précipitines, les sensibilisatrices, les antitoxines, etc., sont, en effet, en circulation dans le plasma.

2° Dans les foyers d'élaboration, ces mêmes substances se trouvent naturellement présentes. Or, dans le cas d'inoculation intravésiculaire, le point d'origine de formation des anticorps est, avant les ganglions, avant la moelle osseuse et la rate, assurément la vésicule dans laquelle on a inoculé l'antigène (1).

(1) Vu la difficulté qu'il y a à apprécier d'une manière exacte la teneur en leucocytes dans le sang périphérique d'un lapin, cette teneur variant dans des limites extrêmes d'un instant à l'autre, 8.800 à 13.000 selon Tallquist et Villebrand, et, d'après Besançon et Labbé (*Traité d'hématologie*, p. 308), « les variations physiologiques étant encore beaucoup plus étendues » et faussant tout résultat, nous nous sommes abstenu de faire les numérations leucocytaires.

Les faits expérimentaux le prouvent (voir 2<sup>e</sup> partie : vibrion cholérique et bacille tuberculeux).

Le contenu vésiculaire est donc doué de propriétés vaccinales au même titre que le sérum. Autrement dit, il semble vraisemblable que les globules blancs, générateurs des anticorps, conservent ces derniers dans leur cytoplasme en proportion si appréciable que la quantité vaccinnante leucocytaire est supérieure à la dose également vaccinnante sérique : c'est-à-dire que la concentration en anticorps est plus grande, à volumes égaux, dans le suc vésiculaire que dans le sérum où ils se trouvent plus ou moins fortement dilués.

Il est donc probable qu'il y aurait intérêt dans ce cas à utiliser, comme moyen d'immunisation, non pas le sérum, mais les globules blancs qui en contiennent toutes les substances actives, et ne paraissent pas présenter, par contre, les mêmes propriétés toxiques.

La présence des leucocytes dans la vésicule persiste très longtemps. Quel que soit l'antigène inoculé, à l'autopsie, on trouve toujours dans la poche vésiculaire des globules blancs ; ils ne sont jamais complètement détruits et résorbés ; après 5, 6 et 7 mois (date ultime à laquelle nous avons sacrifié les animaux), la vésicule a conservé son contenu leucocytaire, la proportion des éléments vivants aux éléments morts paraissant passer par trois phases successives :

1<sup>o</sup> Dans la première, qui suit l'opération, et qui dure de 24 à 48 heures, les leucocytes sont en grande partie détruits, aussitôt leur arrivée dans la vésicule.

2<sup>o</sup> Dans une seconde période, allant du 2<sup>e</sup> au 15<sup>e</sup> jour environ, c'est-à-dire durant toute la phase d'élaboration des anticorps, la proportion des éléments vivants l'emporte sur celle des éléments tués.

3<sup>o</sup> Dans une troisième et dernière période, débutant vers le 15<sup>e</sup> jour et dont la terminaison ne se fait que très tardivement, de nouveau la proportion de cellules dégénérées vésiculaires est supérieure à celle des cellules encore jeunes.

Par contre, la vitalité des corps microbiens dans la vésicule se montre de courte durée. Après 15 jours, dans tous les cas de choléra observés, l'eau peptonée, ensemencée avec le liquide vésiculaire restait stérile et les frottis de ce

liquide n'indiquaient jamais la présence de corps vibrioniens.

Pourtant, d'autres bactéries semblent résister davantage à l'afflux considérable des leucocytes : le bacille tuberculeux aviaire, 6 mois après son inoculation dans la vésicule, était encore en abondance quoique en quantité moindre qu'au début ; ses formes étaient nettes et le protoplasme se colorait très aisément. Mais ces bacilles devaient être, sinon tués, du moins excessivement atténués, puisque le contenu de la vésicule n'est jamais parvenu, en injection intraveineuse, à tuer le lapin, et en injection sous-cutanée, à déterminer des lésions chez le cobaye, alors que les témoins inoculés, avec la même dose de bacilles frais, mouraient dans un espace de temps très court (lapin) ou présentaient des lésions tuberculeuses (cobaye).

Ce fait que, très longtemps, plusieurs mois après l'inoculation, la vésicule montre encore la présence de leucocytes (la plupart dégénérés), doit faire émettre l'hypothèse que le sujet est encore en état d'immunité ou que la vaccination persiste. Et, en effet, 4 mois après l'injection intra-vésiculaire de bacilles tuberculeux, l'inoculation à dose mortelle en injection veineuse de nouveaux bacilles ne provoquait aucune réaction chez l'animal ; l'immunité avait donc persisté durant tout ce laps de temps. Il est probable qu'elle se maintient encore beaucoup plus longtemps.

S'il paraît vraisemblable que la formation des anti-corps est due essentiellement au contenu vésiculaire, la suppression de la vésicule fera cesser l'immunité. Elle doit replacer l'animal dans son état antérieur de réceptivité, le jour où les substances vaccinantes répandues dans l'organisme seront éliminées.

Et c'est, en effet, ce que l'on constate

*Exemple :* Lapin 82 est inoculé le 1<sup>er</sup> novembre intravésiculairement (vésicule liée) avec une culture cholérique en eau peptonée.

10 jours après l'opération, le taux agglutinatif de 1/10 (chiffre initial) s'élève à 1/500 et s'y maintient.

20 jours après l'inoculation, l'animal est opéré à nouveau et la vésicule biliaire, gonflée, légèrement hypertrophiée, aux parois épaissies et déjà indurées, et au contenu leucocytaire assez abondant, est réséquée.



15 jours après cette ablation vésiculaire, le taux agglutinatif était redescendu à 1/10.

Dans la plupart des méthodes d'immunisation, il est une période comprise entre l'inoculation vaccinnante et l'apparition des anticorps dans le sang, véritable phase négative pendant laquelle le sujet est en état de réceptivité vis-à-vis de l'affection contre laquelle on l'immunise. Besredka, par sa méthode des bacilles sensibilisés, est arrivé à supprimer cette période d'hypoimmunisation. Par les procédés d'inoculation intravésiculaire, cette phase négative serait également absente. Chez deux lapins, l'un déjà inoculé intravésiculairement avec une cul-

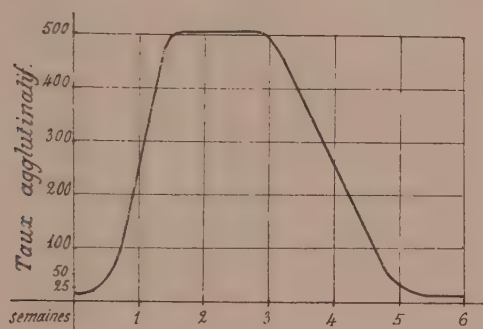


FIG. 4.

ture cholérique, l'autre neuf, une injection intraveineuse à dose minima mortelle détermine la mort dans le même laps de temps (en l'espèce, 10 à 12 heures). Et de même, une dose maxima non mortelle ne détermine la mort chez aucun des deux sujets. Il n'y a donc pas non plus d'hypersensibilité réceptrice chez l'animal inoculé intravésiculairement quelques jours auparavant.

#### IMPERFECTIONS DE L'INOCULATION DANS LA VESICULE BILIAIRE

L'immunisation par la vésicule biliaire se trouve en défaut dans le cas des bacilles peu virulents, et ne peut être employée, sans modifications, dans le cas des bacilles trop virulents.

1° Dans le premier cas, la quantité inoculée, nécessairement

toujours faible, n'amène pas la formation d'anticorps. C'est ce qui nous arriva avec le coli-bacille, par exemple (voir 2<sup>e</sup> partie). Le sérum d'animaux opérés 8, 15 et 25 jours auparavant, ne présentait aucune des substances agglutinantes, précipitantes, indicatrices ou contemporaines de la vaccination.

Cela d'ailleurs ne fait que rentrer dans la loi générale, qui préside à l'immunisation, et d'après laquelle la proportion d'anticorps varie parallèlement à la toxicité ou à la virulence de l'antigène injecté ;

2° Dans le second cas, les bactéries inoculées se généralisent à l'intérieur de l'organisme, causant rapidement la mort de l'animal. L'injection intravésiculaire s'est comportée comme une injection intraveineuse, offrant les mêmes inconvénients et les mêmes dangers. C'est là ce qui survient lors de toute inoculation intravésiculaire charbonneuse ; la mort arrive régulièrement 48 à 52 heures après l'opération. Il en est de même avec les bacilles diphtériques, dysentériques, les staphylocoques, streptocoques et pneumocoques. Certains bacilles, le vibron cholérique, par exemple, restent le plus souvent localisés dans la vésicule, mais dans quelques cas que l'on ne peut prévoir, ils passent dans la circulation générale et tuent l'animal.

On peut tenter le maintien de bactéries virulentes dans l'intérieur de la vésicule, soit en atténuant leur virulence, soit en renforçant l'afflux leucocytaire. On obtiendra d'excellents effets avec les deux procédés employés de concert. L'atténuation seule de la virulence donne déjà de bons résultats. Elle peut être facilement obtenue par le chauffage au bain-marie des cultures entre 55 et 60 degrés durant 1/2 à 1 heure. Les bactéries ainsi modifiées deviennent plus aisément la proie des leucocytes ; elles ne se généralisent donc dans l'organisme que très difficilement. Par contre, elles provoquent l'élaboration d'anticorps, que l'on met aisément en évidence dans le sérum. Mais la production de ces récepteurs est moins abondante que celle qu'entraînent les bacilles vivants et virulents.

**POURQUOI LA BILE DOIT ÊTRE ÉVACUÉE DE LA VÉSICULE**  
**ACTION ANTILEUCOCYTAIRE**  
**ACTION DIFFÉRENTE SUR DIVERSES BACTÉRIES**

Dans son ensemble, la bile a, vis-à-vis des leucocytes, un pouvoir chimiotactique négatif intense. Les bactéries inoculées dans la vésicule, le suc biliaire non retiré, peuvent parfois rester un temps très long avant de disparaître. Ceci se constate surtout si les bactéries sont en faible proportion, car un double effet chimiotactique sera en jeu; d'une part, l'action retardatrice puissante de la bile; d'autre part, l'action favorisante positive très nette des bactéries ou toxines en petite quantité.

A dose plus élevée, en effet, les corps bactériens et toxiques retardent au contraire la phagocytose et peuvent même l'entraver complètement. Suivant donc la quantité de bile laissée dans la vésicule, et la quantité des bactéries ou toxines ajoutées dans cette même vésicule, on obtiendra un mélange dont l'action résultante sera positive, indifférente ou négative, vis-à-vis de la leucocytose.

Enfin la bile, milieu extrêmement complexe, a également une action propre sur les bactéries, mais les modifications qu'elle peut leur imprimer sont encore profondément différentes suivant les cas, parfois même opposées.

La bile vis-à-vis du pneumocoque (Neufeld, Nicolle et Adil bey), du gonocoque, du méningocoque (Jungano), des diplocoques se rattachant à cette même famille, aura une action bactéricide et lytique puissante. Dans 2 centimètres cubes d'une culture en bouillon de pneumocoque, âgée de 24 heures, une faible quantité (0 cc.1 à 0 cc.2) de bile de bœuf provoquera la destruction, la désintégration complète des éléments bactériens. La culture s'éclaircit en 15 minutes et l'examen direct, l'ensemencement, l'inoculation, révèlent l'absence de tout germe visible, vivant et virulent (phénomène de Neufeld). Les mêmes phénomènes se produisent avec la bile de lapin dans des cultures de méningocoques et de gonocoques.

Au contraire, la bile pure de bœuf, ensemencée avec une culture de bacilles typhiques, colibacilles, paratyphiques, etc.,

favorisera le développement de ces bactéries (milieu d'enrichissement de Conradi pour le bacille d'Eberth); il en est de même avec la bile de lapin ensemencée avec les bacilles typhique, coli et le vibron cholérique. Bien mieux, ce sera un milieu de prédilection pour ces éléments bactériens, qui s'y développeront avec une rapidité beaucoup plus grande que dans toute autre substance nutritive.

D'autre part, la bile paraît avoir une action particulière sur la virulence de certains bacilles, de la tuberculose en particulier, la modifiant, l'atténuant dans des proportions sensibles, à condition toutefois que la bile soit de même origine que le bacille; autrement dit, il est nécessaire d'employer de la bile humaine pour le bacille tuberculeux humain, bovine pour le bacille bovin, etc. (Calmette). On connaît les essais de vaccination très intéressants qui ont été obtenus par cette méthode (Calmette et Guérin) (1).

Mais, là encore, dans tous ces différents cas où l'action de la bile favorise nettement le développement des corps microbiens, sa présence dans la vésicule biliaire paraît être nuisible, car son action leucocytaire répulsive l'emporte de beaucoup sur l'action attirante leucocytaire provoquée par les bacilles.

Il en résulte que l'inoculation de vibron cholérique, par exemple, dans la vésicule biliaire non vidée de son contenu, mais liée, ce qui constitue en réalité un ensemencement du vibron cholérique avec de la bile, déterminera très rapidement la généralisation du vibron dans l'organisme et pourra provoquer la mort, le milieu de culture étant particulièrement favorable, et rien n'entravant le développement.

*Exemple :* Lapin n° 57, inoculé le 21 octobre dans la vésicule biliaire suivant le mode habituel, avec une goutte de culture en eau peptonée de vibron cholérique, âgée de 18 heures, à 37 degrés : 12 heures après l'inoculation, mort. A l'autopsie, peu de lésions; liquide péritonéal peu abondant, mais louche, contenant une proportion énorme de vibrions et de polynucléaires renfermant eux-mêmes des vibrions. La vésicule biliaire est aplatie, flasque, congestionnée, renfermant des

(1) *Annales de l'Institut Pasteur et C. R. de l'Académie des Sciences*, années 1907 à 1912.



placards de cellules muqueuses avec inclusion des vibrions. Si l'on répète la même expérience, mais en ne liant point d'abord la vésicule, on obtient des résultats différents :

*Exemple* : Lapin n° 55, inoculé le 20 juillet intravésicairement avec quelques gouttes d'eau peptonée contenant du vibrion cholérique. Le col vésiculaire n'est pas lié, et la bile est laissée.

Le taux agglutinatif est mesuré 5, 10, 15, 20 et 30 jours après l'opération. Primitivement de 1/10, il ne subit aucune variation et reste identique à ce qu'il était antérieurement.

Le 20 septembre, deux mois après l'inoculation, l'animal est de nouveau opéré; sa vésicule est mise à nu. Son volume n'est pas modifié et son contenu, clair, a conservé sa teinte verdâtre. On retire, par ponctions, quelques gouttes du liquide : sur frottis, on voit des cellules épithéliales en petite quantité et point de vibrions cholériques. L'ensemencement de ce liquide en eau peptonée est cependant positif, et décèle la présence de vibrions.

On pose une ligature de soie sur le col, transformant ainsi la vésicule en cavité close; et on suture la paroi abdominale.

Vingt-quatre heures après, le vibrion cholérique a passé dans la circulation générale (ensemencement positif en eau peptonée de 1 centimètre cube de sang retiré par ponction intracardiaque).

Trente-six heures plus tard, l'animal est mort.

Il résulte de ces faits que le vibrion, contenu dans la vésicule biliaire libre et chargée de bile, pousse abondamment dans ce milieu.

Les évacuations intermittentes de tout le contenu étant fréquentes, les bactéries, au fur et à mesure de leur production, sont rejetées dans l'intestin, où elles ne peuvent causer, chez l'individu adulte, aucun phénomène morbide.

Au contraire, si la vésicule est liée à son col, les vibrions développés avec intensité dans cet excellent milieu, et ne pouvant se déverser dans l'intestin, se répandent dans la circulation générale.

En un mot, que la bile ait une action favorable ou nuisible sur les bactéries, cette action restera toujours minime en regard

de celle beaucoup plus importante qu'elle présente vis-à-vis des leucocytes.

Et quoiqu'il soit très probable que, dans certains cas (nous avons en vue le bacille tuberculeux), la bile bien employée, pourrait, en imprégnant seulement les bacilles laissés quelque temps en contact avec elle et lavés ensuite, être un adjuvant utile, il paraît nécessaire, dans toutes les inoculations intravésiculaires, de vider totalement le contenu biliaire. Par les lavages successifs, à l'eau physiologique et mieux à l'eau légèrement alcalinisée qui a la propriété de dissoudre les éléments biliaries et la mucine, on obtiendra une poche dans laquelle on inoculera les bacilles en cultures pures et non modifiées par le milieu.

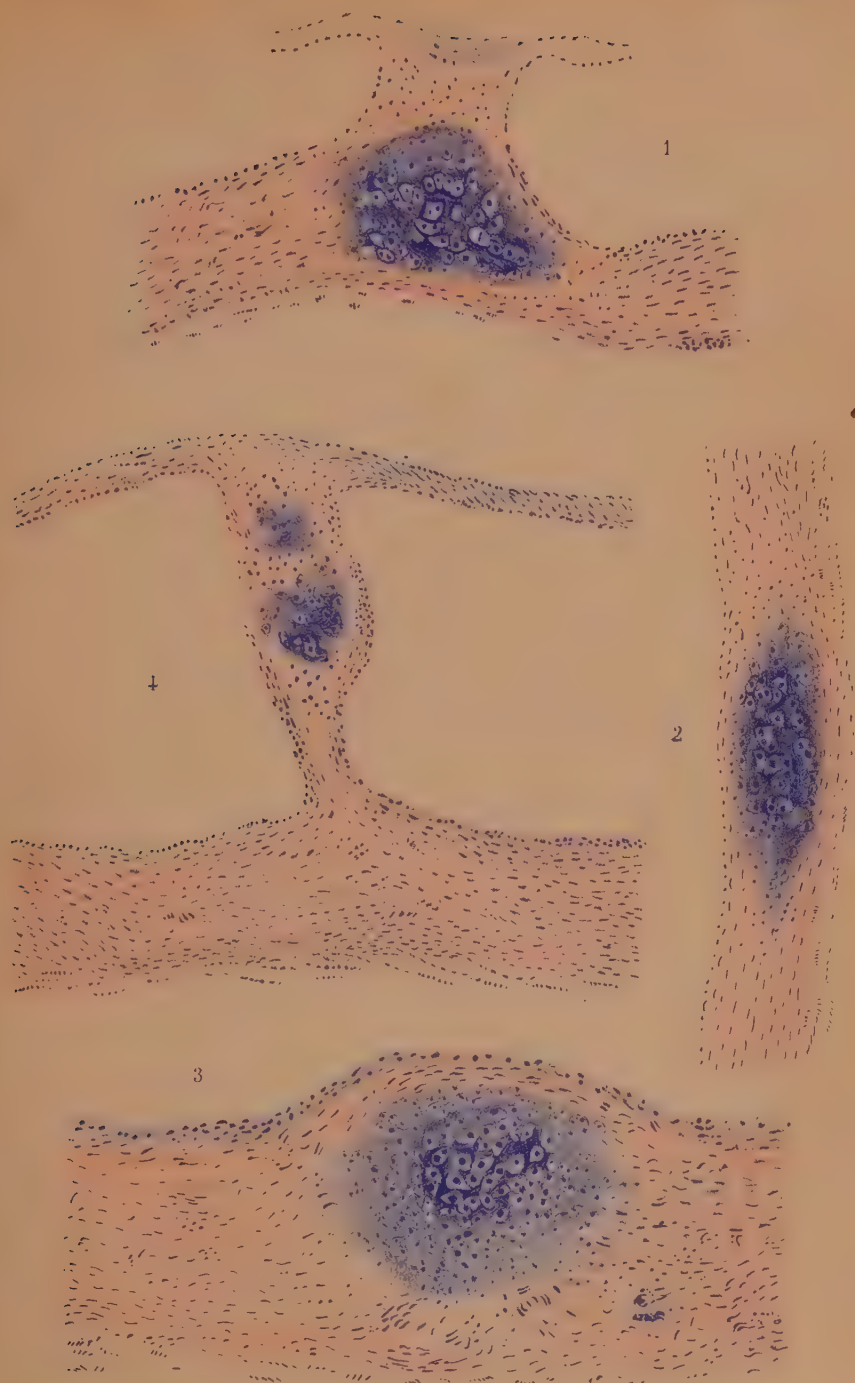
(A suivre.)

---

*Le Gérant : G. MASSON.*

---

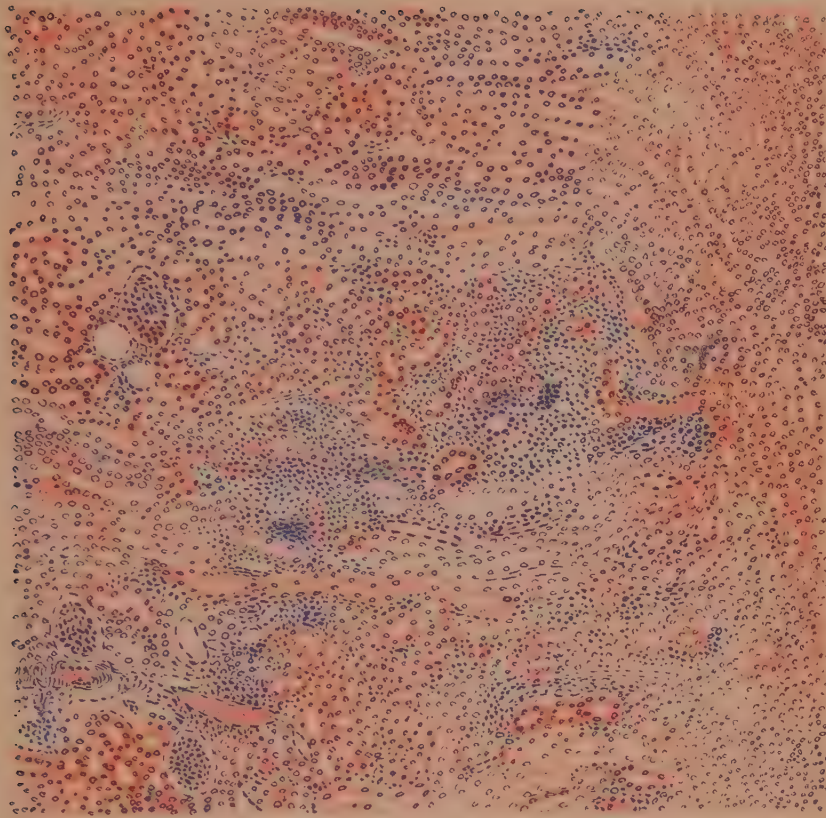
Paris. — L. MARETHEUX, imprimeur, 1, rue Cassette.



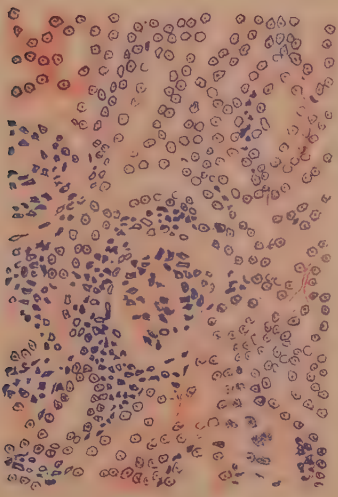




1



2



3

